

Aus dem Lehrstuhl
für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Prof. Dr. Ralph Burkhardt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung der
Serum Konzentration des Melanoma Inhibitory Activity (MIA) Proteins**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Till Schneider

2023

Aus dem Lehrstuhl
für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Prof. Dr. Ralph Burkhardt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung der
Serum Konzentration des Melanoma Inhibitory Activity (MIA) Proteins**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Till Schneider

2023

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Burkhardt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stephan Schreml
Tag der mündlichen Prüfung:	26.02.2024

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Das Melanoma Inhibitory Activity Protein	6
1.2 Präanalytische Einflüsse auf die labormedizinische Diagnostik	7
1.3 Methoden zur Bestimmung von Referenzbereichen.....	8
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	9
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 MIA ELISA.....	11
2.2 Untersuchung der Probenstabilität	11
2.2.1 Probenvorbereitung	11
2.2.2 Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen	12
2.2.3 Lagerung mit wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen	12
2.3 Untersuchung der Interferenzanfälligkeit.....	12
2.3.1 Hämolyse Interferenz.....	13
2.3.2 Ikterie Interferenz.....	14
2.3.3 Lipämie Interferenz.....	15
2.4 Untersuchung der Präzision und Richtigkeit.....	15
2.5 Vergleich der Messergebnisse zweier kommerzieller MIA ELISA	16
2.6 Indirekte Bestimmung laborinterner Serum MIA Referenzbereiche.....	17
2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung	18
2.7.1 Beurteilung der Probenstabilität.....	18

2.7.2	Korrelation zwischen Triglyzerid Konzentration und Lipämie-Index....	19
2.7.3	Methodenvergleich zweier kommerzieller MIA ELISA	19
2.7.4	Beurteilung der Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit der Serum MIA Konzentration	20
2.8	Verwendete Geräte und Materialien	20
3	ERGEBNISSE.....	22
3.1	Probeneinflüsse auf die Messung der MIA Konzentration	22
3.1.1	Kurzzeitige Probenstabilität bei Raumtemperatur.....	22
3.1.2	Langfristige Probenstabilität bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen	23
3.1.3	Stabilität nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen	24
3.1.4	Interferenz durch Hämolyse.....	26
3.1.5	Interferenz durch Ikterie.....	28
3.1.6	Interferenz durch Lipämie.....	30
3.2	Einflüsse des Testverfahrens auf die Messung der MIA Konzentration	32
3.3	Indirekt bestimmte laborinterne Serum MIA Referenzbereiche	37
3.3.1	Deskriptive Statistik des laborinternen Serum MIA Datensatzes	37
3.3.2	Laborinterne Verteilungsmuster und indirekt bestimmte Referenzbereiche der Serum MIA Konzentration	40
4	DISKUSSION	45
4.1	Stabilität des MIA Proteins im Serum	45
4.2	Interferenzanfälligkeit der MIA Konzentrationsmessung.....	47
4.3	Einfluss des Testverfahrens auf die Messung der MIA Konzentration	50
4.4	Referenzbereiche der Serum MIA Konzentration	53

4.4.1	Einordnung der neu berechneten indirekten Serum MIA Referenzbereiche	55
4.4.2	Vor- und Nachteile der indirekten Referenzbereich Bestimmung	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	POSTERBEITRAG.....	73
9	DANKSAGUNG	74

1 EINLEITUNG

1.1 Das Melanoma Inhibitory Activity Protein

Melanoma Inhibitory Activity (MIA) ist ein Protein das erstmals aus Überständen der malignen Melanom Zelllinie HTZ 19-dM isoliert wurde [1–3]. Es hat eine Masse von 11 Kilodalton [2] und besteht aus 107 Aminosäuren als ausgereiftes Protein [3]. Anfangs wurden dem MIA Protein hemmende Eigenschaften auf das Melanom Wachstum zugeschrieben [2,3]. Allerdings zeigten mehrere nachfolgende Studien gegenteilige Ergebnisse, wonach MIA zur Progression, Ausbreitung und Metastasierung des malignen Melanoms beitrage [4–8].

Bereits 1997 wurde eine Studie zum klinischen Nutzen der Serum MIA Konzentrationsbestimmung veröffentlicht, in der von 50 Melanom PatientInnen im American Joint Committee on Cancer (AJCC) Stadium III und Stadium IV alle eine erhöhte MIA Konzentration aufwiesen [9]. Allerdings lagen nur bei 13 % der Stadium I und 23 % der Stadium II PatientInnen erhöhte MIA Konzentrationen vor [9]. Dementsprechend wurde MIA als neuer diagnostischer Serum Marker des malignen Melanoms vorgeschlagen [9]. Auch nachfolgende Studien beschrieben signifikant höhere MIA Konzentrationen bei Personen mit Lymphknotenmetastasen eines Melanoms [10,11], sowie ansteigende MIA Konzentrationen durch Erkrankungsprogress eines metastasierten malignen Melanoms [12]. Auch bei Personen mit Aderhautmelanom wurde MIA als vielversprechender Marker zur Erkennung einer Metastasierung beschrieben [13–16]. Zudem könne MIA potentiell auch zur Beurteilung eines Therapieansprechens verwendet werden [9,17–21].

Neben dem MIA Protein, das derzeit laut Melanom Leitlinie nicht standardmäßig bestimmt wird, hat sich als Tumormarker des Melanoms routinemäßig die Bestimmung des Proteins S100B etabliert [22]. Eine potentielle diagnostische Überlegenheit eines der beiden Tumormarker gegenüber dem anderen wurde mehrfach und teilweise kontrovers diskutiert [18,23–26]. Beispielsweise fanden Juergensen et al. (2001) für Melanom PatientInnen eine Sensitivität der Serum MIA Konzentrationsbestimmung von 77,7 % (AJCC Stadium III) und 84,1 % (Stadium IV), wohingegen der Tumormarker S100B eine Sensitivität von 55,5 % (Stadium III) und 73,9 % (Stadium IV) aufwies [18]. In der genannten Arbeit lag die Spezifität von MIA bei

81,7 % und von S100B bei 80,3 % [18]. Garbe et al. (2003) berechneten anhand von klinisch tumorfreien Melanom PatientInnen im AJCC Stadium II oder III bezüglich Entdeckung neuer Metastasen eine Sensitivität von 29 % für S100B und 22 % für MIA, sowie eine Spezifität von 97 % für MIA und 93 % für S100B [23]. Eine andere Studie berechneten bei AJCC Stadium I und II Melanom PatientInnen die Sensitivität der MIA Konzentrationsmessung für das Erkennen eines Rezidivs während der routinemäßigen Nachsorge mit 67,6 % (Stadium I) und 65,6 % (Stadium II) [27]. Die Spezifität bezogen auf Rezidivfreiheit lag in dieser Studie bei 76,9 % (Stadium I) und 66,7 % (Stadium II) [27]. Manche Studien beschrieben bei fortgeschrittenen Melanomen auch eine optimierte Sensitivität durch Kombination der Tumormarker S100B und MIA [24,28].

In der aktuellen Melanom Leitlinie wurde jedoch bezüglich der MIA Konzentrationsbestimmung festgehalten, dass bei unzureichender Studienlage nicht gesagt werden könne, ob MIA in der Primärdiagnostik des Melanoms bis AJCC Stadium IIB dieselbe prognostische Aussagekraft habe wie der Tumormarker S100B [22]. Auch bei vermuteter oder nachgewiesener lokoregionaler Metastasierung sei laut Leitlinie die Bedeutung von MIA unklar [22].

Als pathogenetischer Mechanismus des MIA Proteins wurde die Hypothese diskutiert, wonach MIA an Fibronectin und Laminin der extrazellulären Matrix binde und somit die Bindungsstellen der Integrine maskiere [29,30]. Außerdem wurde festgestellt, dass MIA durch eine direkte Interaktion mit den Integrinen $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ die Integrin Aktivität herabsetzt [7]. Diese Mechanismen könnten eine metastatische Zellablösung begünstigen [7,29,30].

Neben dem malignen Melanom wurden erhöhte MIA Konzentrationen teilweise auch im Serum von PatientInnen mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Karzinomen gemessen [31]. Außerdem besteht eine Expression in Chondrozyten [32,33], und das Protein konnte bei rheumatoider Arthritis [34] sowie bei physikalischer Belastung im Rahmen eines Marathonlaufs [35] erhöht nachgewiesen werden.

1.2 Präanalytische Einflüsse auf die labormedizinische Diagnostik

Die präanalytische Phase trägt entscheidend zur Qualität in der Labordiagnostik bei [36]. Sie umfasst die Probenahme sowie den Probenumgang und die Bearbeitung des Materials bis zur eigentlichen Analytik [36]. Dabei ist die präanalytische Phase

gegenüber der analytischen und postanalytischen Phase besonders häufig von Fehlern betroffen [37].

Präanalytische Variablen können grob eingeteilt werden in physiologische Faktoren (z.B. Alter, Geschlecht, zirkadianer Rhythmus, Menstruationszyklus, Schwangerschaft), die Probennahme betreffende Faktoren (z.B. Stauungszeit, Körperposition, Probengefäß) und Einfluss- oder Interferenzfaktoren (z.B. zirkulierende Antikörper, Hämolyse, Hyperlipidämie) [36]. Unter den Interferenzfaktoren sind insbesondere hämolytische Proben eine häufige Problematik mit der medizinische Laboratorien konfrontiert werden [38]. So kann es durch in vitro Hämolyse bei einer Vielzahl von Analyten (z.B. Kalium, Laktatdehydrogenase, Aspartat-Aminotransferase) zu Störungen kommen [39,40].

Eine besondere präanalytische Bedeutung hat auch die Stabilität des zu untersuchenden Analyten im jeweiligen Probenmaterial unter verschiedenen Temperaturbedingungen [40]. Diese Probenstabilität ist heutzutage für viele Analyten bereits bekannt [40]. Für das in der vorliegenden Arbeit thematisierte MIA Protein mangelt es jedoch bisher an wissenschaftlichen Untersuchungen zur Stabilität des Proteins unter den labordiagnostisch relevanten Temperaturbedingungen.

1.3 Methoden zur Bestimmung von Referenzbereichen

Die Angabe von Referenzbereichen stellt einen entscheidenden Baustein für die klinische Interpretation der in medizinischen Laboratorien durchgeführten Untersuchungen dar [41,42]. Dabei sollen Referenzbereiche bei der Interpretation von Laborergebnissen helfen, indem sie Vergleichsdaten liefern [43]. Leider mangelt es zur Bestimmung der MIA Serum Konzentration mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA) an solchen Referenzbereichen.

Häufig basiert der Referenzbereich auf den zentralen 95 % der Verteilung der Referenzwerte einer Gruppe von Referenzproben [44,45]. Von Referenzbereichen abzugrenzen sind Leitlinien basierte Entscheidungsgrenzen oder Handlungsgrenzen, wie sie zum Beispiel häufig für die Bewertung der Glukose, HbA1c oder Cholesterin Konzentration verwendet werden [46,47]. Sie stellen Grenzen dar, ab denen therapeutische Interventionen notwendig werden [46]. Die Methoden zur Bestimmung von Referenzbereichen lassen sich in den direkten Ansatz und den indirekten Ansatz unterteilen [41]. Beim direkten Ansatz werden Individuen einer Referenzpopulation

anhand bestimmter Kriterien, die vor oder nach der Probensammlung angewandt werden, selektiert und aus dem von Ihnen gewonnenen Material der gewünschte Analyt bestimmt [41]. Insbesondere weil direkte prospektive Referenzbereich Bestimmungen finanziell sehr aufwändig sind stellen für die meisten Laboratorien indirekte Ansätze eine vielversprechende Alternative dar [48–50]. Bei indirekten Ansätzen werden die Referenzbereiche anhand von bereits in der klinischen Routine erhobenen Messergebnissen berechnet [41]. Hierfür wurde im Rahmen einer Arbeitsgruppe der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e. V. das Programm Reference Limit Estimator (RLE) entwickelt, welches statistische Verfahren auf sehr große Labor Datensätze anwendet, um retrospektiv laborinterne Referenzbereiche zu bestimmen [49,51,52]. Die Funktionalität dieser indirekten Methode, kombiniert mit zusätzlichen direkten Ausschlusskriterien, konnte bereits beispielhaft für Elektrolyt [50] und Kreatinin [48] Bestimmungen dargestellt werden, und diese Methode soll in der vorliegenden Arbeit auch für das MIA Protein Anwendung finden.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Das maligne Melanom ist ein von Melanozyten ausgehender bösartiger Tumor mit hoher Metastasierungstendenz und folglich relativ schlechter Prognose, insbesondere im Stadium der Fernmetastasierung [53]. Gerade deswegen sind verlässliche diagnostische Marker zur Erkennung einer Krankheitsprogression entscheidend [54]. Das Protein MIA steht als solch ein diagnostischer Serummarker in der Diskussion [9,54].

Problematischerweise mangelt es in der Literatur an fundierten Untersuchungen zu präanalytischen Einflussfaktoren der MIA Konzentrationsbestimmung im Serum. Die Präanalytik ist jedoch entscheidend für eine qualitätsorientierte Labordiagnostik und somit auch für eine optimale klinische Krankenversorgung [55]. Insbesondere die Stabilität des MIA Proteins im kurzzeitigen und langfristigen Verlauf unter verschiedenen Temperaturbedingungen oder nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen ist unzureichend bekannt. Diese Wissenslücke sollte, auch in Anbetracht der gängigen Praxis des postalischen Probenversands, geschlossen werden.

Des Weiteren sind Interferenzen durch Hämolyse, Ikterie und Lipämie bekannte präanalytische Probleme der medizinischen Labordiagnostik [39,56,57]. Bislang sind

jedoch die Einflüsse solcher Störgrößen auf die Serum MIA Konzentrationsbestimmung mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay unzureichend geklärt. Dieses Wissen ist allerdings entscheidend für die Interpretation der Serum MIA Konzentration, schließlich könnten verfälschte Ergebnisse zu unnötigen diagnostischen oder therapeutischen Konsequenzen führen.

Neben diesen zu klärenden präanalytischen Faktoren muss das verwendete MIA Bestimmungsverfahren auch hinsichtlich der analytischen Leistungsmerkmale der Präzision und Richtigkeit für den Einsatz in der klinischen Diagnostik geeignet sein. Diesbezüglich wurden bisher zum Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay nur herstellerseitige Ergebnisse in der Packungsbeilage des Tests publiziert [58], weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit umfangreichere Erhebungen dieser analytischen Kenngrößen erfolgen sollten.

Um die Serum MIA Konzentration letztlich klinisch sinnvoll zu interpretieren, ist die Angabe von Referenzbereichen entscheidend [41,42]. Es mangelt jedoch bisher in der Literatur an Untersuchungen zu Referenzbereichen der MIA Serum Konzentration unter Verwendung des Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay.

Zusammenfassend lag das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Klärung wichtiger präanalytischer und analytischer Faktoren der Serum MIA Konzentrationsbestimmung mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay. Des Weiteren sollten indirekt anhand eines großen Datensatzes laborinterne Referenzbereiche der MIA Serum Konzentration statistisch berechnet werden, und ein Vergleich zur Wertelage eines zweiten MIA ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) erfolgen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MIA ELISA

Die quantitative Bestimmung der Serum MIA Konzentration erfolgte mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay – nachfolgend R&D MIA ELISA genannt. Bei diesem Test kommt das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahren zum Einsatz. Dabei ist ein für humanes MIA spezifischer monoklonaler Antikörper in den Wells der ELISA Platte vorbeschichtet. Hieran bindet das in der Probe enthaltene MIA Protein. Nach einem Waschschrift wird ein für humanes MIA spezifischer, Meerrettichperoxidase-markierter polyklonaler Antikörper hinzugegeben, der an das in den Wells gebundene MIA Protein bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substrat Lösung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin hinzugefügt, die durch das Enzym mit einem Farbumschlag reagiert, der proportional zur MIA Konzentration gemessen werden kann.

Die Durchführung des Tests erfolgte nach Packungsbeilage des Herstellers. Aus Praktikabilitätsgründen wurde jedoch für die Herstellung des Waschpuffers teilweise 21 ml Wash Buffer Concentrate in 500 ml vollentsalztem Wasser gemischt, und die Waschschrift erfolgte mit 300 µl des Waschpuffers. Für die Absorptionsmessungen kamen Sunrise Absorptions-Mikroplatten-Reader (Tecan Group Ltd., Schweiz) zum Einsatz. Zur Erstellung der Standardkurve erfolgten Messungen im Duplikat. Pro Ansatz wurden drei ansteigend konzentrierte MIA Kontrollen (Quantikine ELISA Kit Controls, Control Set 788 (R&D Systems Inc., USA)) als Messung im Duplikat mitgeführt. Gefrorene Proben wurden vor Durchführung des Tests zunächst 30-60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut.

2.2 Untersuchung der Probenstabilität

2.2.1 Probenvorbereitung

Für die Untersuchung der Probenstabilität wurden 24 gepoolte Serum Proben erstellt. Dabei wurde Restmaterial aus der Routinediagnostik des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg anonymisiert verwendet. Visuell hämolytische Proben wurden ausgeschlossen. Für jede Probe wurden 4-7 Seren gepoolt. Anschließend wurden Aliquots zu je 100 µl in 0,5 ml Mikro-

Schraubröhren (Sarstedt AG & Co KG, Deutschland) angelegt und bis zum Versuchsbeginn bei -80 °C gelagert. Lediglich die Aliquots für die Ausgangsmessung zum Zeitpunkt null betragen 200 µl, da hier eine Doppelmessung erfolgte.

2.2.2 Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen

Zu Beginn wurden alle Aliquots aus Abschnitt 2.2.1 gleichzeitig aus der -80 °C Lagerung in Raumtemperatur warme Lagerungsboxen überführt. 1 Stunde nach Entnahme aus dem -80 °C Gefrierschrank wurden die Aliquots als aufgetaut angesehen (Zeitpunkt null) und es erfolgte eine Verteilung auf die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen: Raumtemperatur (30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 1 Tag, 2 Tage), Kühlschrank (4-6 °C) (1 Tag, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage), -20 °C (1 Tag, 2 Tage, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage), sowie Lagerung mit wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen (siehe Abschnitt 2.2.3). Abschließend wurden die Aliquots bis zur endgültigen Einfachmessung der MIA Konzentration bei -80 °C zwischengelagert. Die Ausgangskonzentration aller Proben wurde ohne Zwischenlagerung zum Zeitpunkt null als Doppelmessung bestimmt.

2.2.3 Lagerung mit wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen

Um die Probenstabilität nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen zu beurteilen wurden Aliquots aus Abschnitt 2.2.1 initial bis zum Versuchsbeginn bei -80 °C gelagert. Es folgte ein Auftauvorgang für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Aliquots zweimal im Wechsel für 2 Stunden bei -20 °C gefroren und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem letzten Auftauvorgang wurden die Aliquots bei -80 °C für 3 Tage bis zur endgültigen Einfachmessung der MIA Konzentration gelagert.

2.3 Untersuchung der Interferenzanfälligkeit

Zur Testung der Interferenzanfälligkeit des R&D MIA ELISA durch hämolytische, ikterische oder lipämische Proben wurden je 4 gepoolte Serumproben mit selbst hergestellten Hämolysat, direkten Bilirubin Standard oder Lipofundin MCT 20 % (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und anschließend die MIA Konzentration bestimmt, um Messabweichungen zu erkennen (Spike-Versuch).

Als Probenmaterial wurde Serum Restmaterial anonymisiert aus der Routinediagnostik des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg gesammelt und insgesamt 12 gepoolte Proben aus je 2-3 Seren hergestellt. Alle Seren waren visuell nicht hämolytisch, ikterisch oder lipämisch. Die Seren stammten von Personen im Alter ≥ 18 Jahre, und Proben mit Extragradiant (bei vorhandener Eiweißelektrophorese) oder monoklonalem Protein (bei vorhandener Immunfixation) wurden ausgeschlossen. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur Weiterverwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.1 Hämolyse Interferenz

Für den Hämolyse Spike-Versuch kam die Methode nach Meites (1973) [59] in modifizierter Form zur Anwendung, wie in einer Publikation von Dimeski (2008) beschrieben [60]. Zur Herstellung eines Hämolysats wurden zwei anonymisierte Lithium-Heparin Proben aus der Routinediagnostik des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg verwendet. Dabei handelte es sich um Restmaterialien erwachsener Personen ohne visuelle Hämolyse, Ikterie oder Lipämie. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 RPM. Anschließend wurde das Plasma entfernt, wobei darauf geachtet wurde den buffy coat nicht mit zu entfernen um auch eine Lyse von Leukozyten und Thrombozyten zu erfassen [61]. Das von der Probe entfernte Plasma wurde durch das gleiche Volumen NaCl 0,9 % (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) ersetzt. Die Proben wurden durch Schwenken resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit Zentrifugationen. Nach dem vierten Waschschrte wurde die NaCl 0,9 % Lösung abgenommen und durch das gleiche Volumen Aqua (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) ersetzt und erneut durch Schwenken suspendiert. Es folgte eine Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für circa 2,5 Tage. Anschließend wurden die Proben aufgetaut, durch Schwenken resuspendiert und für 10 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Die Überstände der beiden hämolysierten Proben wurden gepoolt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das gepoolte Hämolysat wurde 1:100 mit NaCl 0,9 % verdünnt und das freie Hämoglobin an einem cobas c503 Analysemodul des Analysesystems cobas pro (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) durch einen kolorimetrischen Test (Catachem Inc., USA), basierend auf den Arbeiten von Standefer und Vanderjagt (1977) [62] sowie Lijana und Williams

(1979) [63], bestimmt. Hiervon ausgehend wurde die freie Hämoglobin Konzentration des gepoolten Hämolysats berechnet. Anschließend wurden Stammlösungen in ansteigenden Konzentrationen hergestellt und bis zum Versuchsbeginn bei -20 °C gelagert.

Für den Spike-Versuch wurden den aliquotierten Proben ansteigend konzentrierte Hämolysat Stammlösungen entsprechend einer 1:10 Verdünnung hinzugefügt. Als Referenzwert diente ein Spike mit NaCl 0,9 %. Es folgte die Bestimmung der MIA Konzentration nach dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Schema als Einfachmessung. Zudem wurde zeitnah für alle Aliquots an einem cobas c503 die freie Hämoglobin Konzentration kolorimetrisch [62,63] mit dem Plasma Free Hemoglobin Kit (Catachem Inc., USA) bestimmt. Dabei erfolgten nach Bedarf manuelle Vorverdünnungen mit NaCl 0,9 % um Proben mit extrem hohen freien Hämoglobin Konzentrationen messen zu können. Als Kalibrator diente der Plasma Free Hemoglobin Calibrator (Catachem Inc., USA). Als Kontrollen kamen Plasma Free Hemoglobin Control Level 1 und Control Level 2 (Catachem Inc., USA) zum Einsatz.

2.3.2 Ikterie Interferenz

Als Interferent für den Ikterie Spike-Versuch wurde Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz (EMD Millipore Corp., USA) als direkter Bilirubin Standard in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Hierfür wurde das Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz Pulver zunächst nach Herstellerangabe in Aqua gelöst und anschließend Stammlösungen in verschiedenen direkten Bilirubin Zielkonzentrationen hergestellt (300 mg/dl, 150 mg/dl, 50 mg/dl, 25 mg/dl, 2,5 mg/dl). Anschließend wurden die Stammlösungen des Interferenten den aliquotierten Proben entsprechend einer 1:10 Verdünnung hinzugefügt. Als Referenzwert diente ein Spike mit 25 µl Aqua. Es folgte die Bestimmung der MIA Konzentration nach dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Schema als Einfachmessung. Zudem wurde zeitnah für alle Aliquots an einem cobas c503 Analysemodul die direkte Bilirubin Konzentration kolorimetrisch mittels Bilirubin Direct Gen.2 (Jendrassik-Grof) Assay (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) bestimmt. Dabei erfolgten nach Bedarf manuelle Vorverdünnungen mit NaCl 0,9 % um Proben mit extrem hohen direkten Bilirubin Konzentrationen messen zu können. Als Kalibrator diente Calibrator for automated systems (Roche

Diagnostics GmbH, Deutschland). Als Kontrollen kamen PreciControl ClinChem Multi 1 und Multi 2 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) zum Einsatz.

2.3.3 Lipämie Interferenz

Als Interferent für den Lipämie Spike-Versuch wurde Lipofundin MCT 20 % in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Hierfür wurden zunächst Stammlösungen in verschiedenen Triglyzerid Zielkonzentrationen hergestellt (40000 mg/dl, 20000 mg/dl, 5000 mg/dl, 2500 mg/dl, 500 mg/dl), wobei zur Verdünnung Aqua genutzt wurde. Anschließend wurden die Stammlösungen des Interferenten den aliquotierten Proben entsprechend einer 1:10 Verdünnung hinzugefügt. Als Referenzwert diente ein Spike mit 25 µl Aqua. Es folgte die Bestimmung der MIA Konzentration nach dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Schema als Einfachmessung. Zudem wurde zeitnah für alle Aliquots mit dem Triglycerides Assay (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) an einem cobas c503 Analysemodul die Triglyzerid Konzentration mittels enzymatischer (Lipoproteinlipase, Glycerinkinase, Glycerinphosphatoxidase und Peroxidase) kolorimetrischer Methode bestimmt. Hierbei diente Calibrator for automated systems als Kalibrator, sowie PreciControl ClinChem Multi 1 und Multi 2 als Kontrollen. Außerdem wurden für alle Aliquots die Lipämie-Indices (Sample Index Gen.2 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland)), die auf Extinktionsmessungen bei 660 nm und 700 nm basieren, am cobas c503 Analysemodul gemessen und dokumentiert.

2.4 Untersuchung der Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der analytischen Präzision und Richtigkeit des R&D MIA ELISA wurden sowohl die MIA Konzentrationen der drei Quantikine ELISA Kit Controls als auch von gepoolten Serum Proben nach dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Schema bestimmt. Bei den Quantikine ELISA Kit Controls handelte es sich um Kontrollen derselben Charge auf drei verschiedenen MIA Konzentrationsniveaus (niedrige, mittlere und hohe Konzentration) mit den herstellerseitigen Zielbereichen (± 3 Standardabweichungen) 125-204 pg/ml, 244-398 pg/ml und 478-779 pg/ml. Als Zielkonzentration wurde der jeweilige Mittelwert aus oberer und unterer Grenze des Zielbereichs zugrundegelegt. Ergänzend wurde Restmaterial aus der Routinediagnostik des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des

Universitätsklinikums Regensburg anonymisiert verwendet, um aus je 2-3 Serum Proben mit vorbekannten MIA Konzentrationen 6 gepoolte Serum Proben herzustellen. Dabei wurden jeweils 2 gepoolte Proben auf eine niedrige (ca. 600 pg/ml), mittlere (ca. 1200 pg/ml) und erhöhte (ca. 2400 pg/ml) MIA Zielkonzentration eingestellt. Diese gepoolten Proben wurden anschließend aliquotiert und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Um die Präzision und Richtigkeit innerhalb eines Analysenlaufs (Intra-Assay) zu beurteilen wurden die Kontrollen und die 6 gepoolten Serum Proben auf einer ELISA Platte fünffach gemessen, und aus den Ergebnissen die Variationskoeffizienten ($(\text{Standardabweichung} \div \text{Mittelwert}) [\%]$) berechnet. Zusätzlich wurde aus den Messungen der Kontrollen die relative Unrichtigkeit nach folgender Formel berechnet: $(\text{Mittelwert der Wiederholungsmessungen} - \text{Zielwert}) \div \text{Zielwert} [\%]$.

Um die Präzision und Richtigkeit zwischen verschiedenen Analysenläufen (Inter-Assay) zu beurteilen wurden die MIA Konzentrationen der Kontrollen an zwölf unterschiedlichen Tagen im Duplikat bestimmt, und aus diesen Mittelwerten wiederum die Variationskoeffizienten und die relative Unrichtigkeit berechnet. Dabei erfolgten die Messungen der Kontrollen durch sechs unterschiedliche technische MitarbeiterInnen mit insgesamt drei unterschiedlichen Chargen des R&D MIA ELISA.

Ergänzend wurden die MIA Konzentrationen der 6 gepoolten Serum Proben an fünf unterschiedlichen Tagen als Einfachmessung quantifiziert, und hieraus die Inter-Assay Variationskoeffizienten berechnet. Diese Messungen erfolgten durch fünf unterschiedliche technische MitarbeiterInnen mit einer einzelnen Charge des R&D MIA ELISA Immunoassay.

2.5 Vergleich der Messergebnisse zweier kommerzieller MIA ELISA

Die Rohdaten dieses Kapitels basieren auf Vorarbeit zur laborinternen MIA Validierung am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg.

Es wurde ein Vergleich zwischen den MIA Konzentrationen des R&D MIA ELISA und den MIA Konzentrationen des Roche human MIA ELISA – nachfolgend Roche MIA ELISA genannt – durchgeführt. Hierfür wurden die MIA Konzentrationen von gefrorenen Serumproben der Routinediagnostik vergleichend als Einfachmessung nach Packungsbeilage der Hersteller bestimmt (n=19). Zusätzlich wurde eine Probe

mit extrem hoher MIA Konzentration sowohl mit dem R&D MIA ELISA als auch mit dem Roche MIA ELISA bestimmt. Diese Probe wurde in die graphische und statistische Auswertung nicht miteinbezogen, um eine Verzerrung zu vermeiden.

2.6 Indirekte Bestimmung laborinterner Serum MIA Referenzbereiche

Für die indirekte Bestimmung laborinterner Serum MIA Referenzbereiche (MIA $\leq 97,5$. Perzentile) wurde das RLE Programm in Version RLE49 20180517 der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e. V. verwendet, welches unter Nutzung von Excel (Microsoft Corporation, USA) und dem Statistikprogramm R funktioniert [49,51,52]. Dieses Programm ermöglicht retrospektiv unter bestimmten Modellannahmen bei einem großen Messdatensatz über statistische Verfahren eine Trennung der Verteilung der pathologischen und nicht-pathologischen Messdaten [49,52]. Dies ist möglich unter der Annahme, dass in einem sehr großen Datensatz der Anteil pathologischer Werte an der Gesamtheit gering ist [52,64].

Zusammenfassend erfolgte zunächst der Transfer des am Institut vorhandenen Datensatzes der MIA Konzentrationsmessungen in das RLE Programm. Nachfolgend schätzt das Programm eine geglättete Kerndichtefunktion für den gesamten Datensatz bestehend aus nicht-pathologischen und pathologischen Werten [48,49]. Unter der Annahme, dass der zentrale Hauptteil dieser Verteilungen die nicht-pathologische Population darstellt, erfolgt auf diesen Teil eine Box-Cox Transformation [48,49]. Aus diesen Box-Cox transformierten Daten wird die Gauß-Verteilung geschätzt und deren Perzentilen berechnet [48,49].

Der zur Berechnung der Serum MIA Referenzbereiche verwendete Datensatz bestand aus retrospektiv erfassten, pseudonymisierten MIA Konzentrationsmessungen aus Serum, die mittels R&D MIA ELISA durchgeführt wurden. Der Datensatz umfasste den Zeitraum 05.09.2018-06.04.2022, wobei das Messdatum zugrunde gelegt wurde. In die Berechnungen wurden männliche und weibliche Personen im Alter ≥ 18 Jahre eingeschlossen, wobei das Alter aus dem Geburtsdatum und dem Laboreingangsdatum berechnet wurde. Lediglich die erste gemessene MIA Konzentration jeder Person wurde verwendet. Die Zuordnung zu derselben Person erfolgte dabei anhand einer PatientInnen-Identifikationsnummer. Im seltenen Fall, dass eine Person sowohl stationär als auch ambulant eine MIA Konzentrationsbestimmung erhielt, wurde vom Laborsystem automatisch eine zweite

PatientInnen-Identifikationsnummer zur selben Person generiert, die dadurch in der Auswertung möglicherweise doppelt erfasst wurde. Einzelne fehlerhafte oder nicht eindeutig quantifizierte Messergebnisse wurden ausgeschlossen, darunter eine MIA Konzentrationsmessung <15 pg/ml und drei Messungen mit MIA >42000 pg/ml, >8000 pg/ml und >4000 pg/ml. Es erfolgte kein Ausschluss bestimmter EinsenderInnen. Bei den EinsenderInnen handelte es sich sowohl um klinikinterne als auch um externe EinsenderInnen aus der ambulanten Krankenversorgung, wobei die Anzahl ambulanter Einsendungen überwog. Zu präanalytischen Faktoren wie Abnahmebedingungen, Lagerungsdauer und Transportbedingungen vor Eintreffen in unserem Labor lagen keine Informationen vor. Es wurden sowohl ungefroren als auch gekühlt und gefroren eingegangene Seren gemessen. Es lagen keine Informationen zum Schwangerschaftsstatus vor. Ein Proben Ausschluss aufgrund visueller Hämolyse, Ikterie oder Lipämie erfolgte nicht. Die Seren wurden in der Regel über einen Zeitraum von einer Woche bei -20 °C gesammelt und anschließend einmal wöchentlich gemessen. In den RLE Programmeinstellungen wurde für die Verteilung der Daten das Power-Normal Modell verwendet, und die überwiegende Lage pathologischer Werte wurde für den hohen Bereich eingestellt.

2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung

Statistische Auswertungen erfolgten in der vorliegenden Arbeit, sofern nicht anders angegeben, mit SPSS Version 28.0.0.0 (IBM Corporation, USA). Die graphischen Auswertungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, mit QtiPlot Version 5.12.8 (IONDEV SRL, Rumänien).

2.7.1 Beurteilung der Probenstabilität

Für die Beurteilung der Probenstabilität (siehe Abschnitt 2.2) wurde eine Abweichung als relevant eingestuft, wenn sich die mittlere MIA Konzentration über 10 % vom Ausgangswert unterschied, und diese Abweichung auch unter Berücksichtigung der ± 1 Standardabweichung gegeben war.

Im Rahmen der Untersuchung der Probenstabilität wurden außerdem die absoluten MIA Konzentrationen nach 2 Tagen bei Raumtemperatur gegenüber den Ausgangskonzentrationen, sowie gegenüber den Konzentrationen nach 2 Tagen bei -20 °C, in gepaarten t-Tests verglichen. Zuvor wurde im Shapiro-Wilk Test eine

Normalverteilung der Differenzen (2 Tage bei Raumtemperatur gegenüber Ausgangskonzentration ($p=0,118$) bzw. gegenüber 2 Tage bei -20 °C ($p=0,621$)) nachgewiesen.

Zur Beurteilung der Probenstabilität nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf einem 5 % Signifikanzniveau durchgeführt. Zuvor wurde im Shapiro-Wilk Test festgestellt, dass die Differenzen der absoluten MIA Konzentrationen vor und nach den wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen nicht normalverteilt waren ($p=0,003$). Jedoch waren die Differenzen im Histogramm visuell symmetrisch verteilt. Ergänzend wurde unter Verwendung einer interaktiven Internetseite zum analytischen Methodenvergleich ein Bland-Altman-Diagramm erstellt [65,66].

2.7.2 Korrelation zwischen Triglyzerid Konzentration und Lipämie-Index

Im Rahmen der Untersuchung auf Interferenzen durch Lipämie (siehe Abschnitt 2.3.3) wurde die Spearman-Korrelation zwischen Triglyzerid Konzentration und Lipämie-Index auf einem 1 % Signifikanzniveau berechnet. Triglyzerid Konzentrationen und Lipämie-Indices waren im Shapiro-Wilk Test nicht normalverteilt ($p<0,001$).

2.7.3 Methodenvergleich zweier kommerzieller MIA ELISA

Im Rahmen des Vergleichs der Messergebnisse zweier kommerzieller MIA ELISA (siehe Abschnitt 2.5) wurde die Pearson Produkt-Moment Korrelation auf einem 1 % Signifikanzniveau berechnet. Zuvor wurde im Shapiro-Wilk Test eine Normalverteilung der R&D MIA Konzentrationen [pg/ml] ($p=0,934$) und Roche MIA Konzentrationen [pg/ml] ($p=0,912$) festgestellt. Zudem lagen im Box-Plot Diagramm keine Ausreißer vor. Ergänzend wurde unter Verwendung einer interaktiven Internetseite zum analytischen Methodenvergleich die Passing-Bablok-Regression und ein Bland-Altman-Diagramm statistisch und graphisch erstellt [65,66]. Dabei waren die Differenzen zwischen R&D MIA [pg/ml] und Roche MIA [pg/ml] im Shapiro-Wilk Test normalverteilt ($p=0,919$).

2.7.4 Beurteilung der Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit der Serum MIA Konzentration

Im Rahmen der indirekten Bestimmung laborinterner Serum MIA Referenzbereiche (siehe Abschnitt 2.6) ergaben sich zusätzlich die Fragen nach einer Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit der Serum MIA Konzentration.

Aufgrund der Frage nach einer Altersabhängigkeit erfolgte eine Einteilung aller MIA Konzentrationsmessungen nach Altersgruppe (18-30 Jahre, 31-60 Jahre, >60 Jahre). Unterschiede zwischen diesen Altersgruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests), beurteilt, wobei das Signifikanzniveau jeweils 5 % betrug. Zur Beurteilung der Effektstärke wurde aus den Ergebnissen der Dunn-Bonferroni-Tests der Korrelationskoeffizient r berechnet. Zuvor wurde im Shapiro-Wilk Test festgestellt, dass die MIA Konzentrationen in den drei Altersgruppen nicht normalverteilt waren ($p < 0,001$).

Unterschiede der MIA Serum Konzentration zwischen männlichen und weiblichen Personen ≥ 18 Jahre wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf einem 5 % Signifikanzniveau bewertet. Zuvor erbrachte ein Shapiro-Wilk Test, dass die Serum MIA Konzentrationen männlicher und weiblicher Personen ≥ 18 Jahre nicht normalverteilt waren ($p < 0,001$).

2.8 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien.

Artikel	Hersteller
Aqua	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Bilirubin Direct Gen.2 (Jendrassik-Grof) Assay	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Bilirubinkonjugat, Ditaurat, Dinatriumsalz	EMD Millipore Corp., USA
Calibrator for automated systems	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Cobas c503 Analysemodul	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Diluent NaCl 9 %	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Lipofundin MCT 20 %	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 0,5 ml, PP	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Plasma Free Hemoglobin Calibrator	Catachem Inc., USA
Plasma Free Hemoglobin Control Level 1	Catachem Inc., USA

Plasma Free Hemoglobin Control Level 2	Catachem Inc., USA
Plasma Free Hemoglobin Kit	Catachem Inc., USA
PreciControl ClinChem Multi 1	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
PreciControl ClinChem Multi 2	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay	R&D Systems Inc., USA
Quantikine ELISA Kit Controls, Control Set 788	R&D Systems Inc., USA
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co KG, Deutschland
Sample Index Gen.2 Assay	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Sunrise Absorptions-Mikroplatten-Reader	Tecan Group Ltd., Schweiz
Triglycerides Assay	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

3 ERGEBNISSE

3.1 Probeneinflüsse auf die Messung der MIA Konzentration

3.1.1 Kurzzeitige Probenstabilität bei Raumtemperatur

Die MIA Ausgangskonzentrationen der Stabilitätsversuche lagen im Bereich 618-1578 pg/ml (Median (MD)=988 pg/ml). In Abbildung 1 sind die Mittelwerte (MW) der relativen MIA Konzentrationen, bezogen auf den Ausgangswert, nach kurzzeitiger Probenlagerung bei Raumtemperatur dargestellt. Nach bis zu 4 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur wurden keine Unterschiede der relativen MIA Konzentrationen >10 % des Ausgangswerts festgestellt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur ließ sich zunächst ein leichter Anstieg der relativen MIA Konzentration auf $105,6 \pm 5,1$ % des Ausgangswerts verzeichnen. Im weiteren zeitlichen Verlauf fiel die relative MIA Konzentration nach 1 Stunde auf $102,3 \pm 4,5$ % und nach 2 Stunden auf $98,3 \pm 4,5$ %. Die relative MIA Konzentration nach 4 Stunden lag bei $103,1 \pm 3,3$ %.

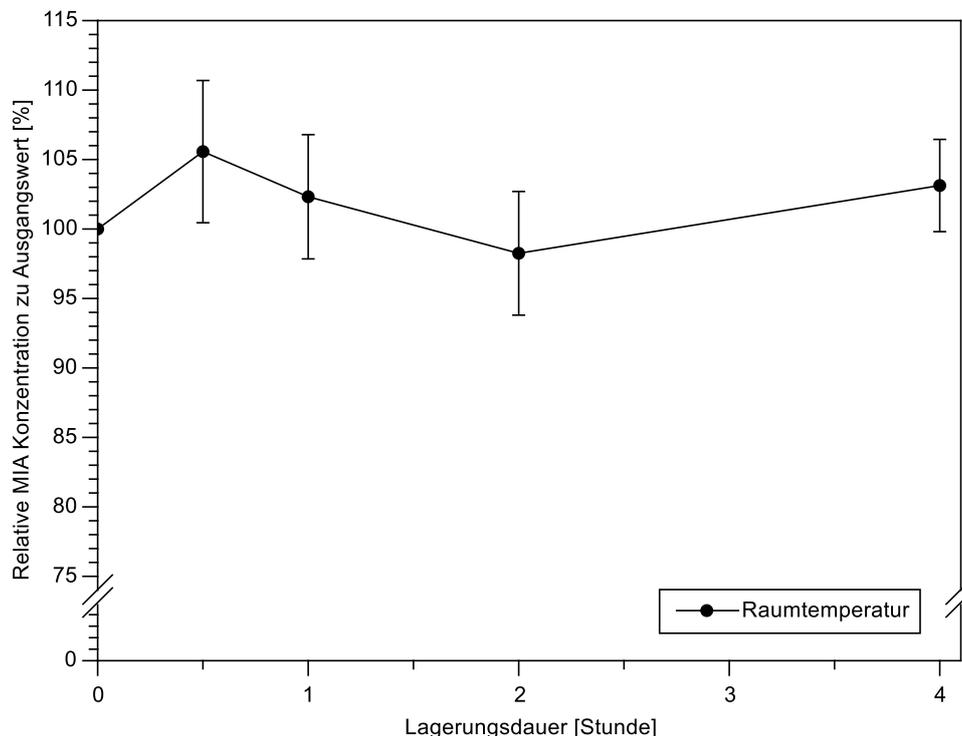


Abbildung 1: Auf den Ausgangswert (Zeitpunkt null) normalisierte relative MIA Konzentrationen nach kurzzeitiger Probenlagerung bei Raumtemperatur. Nach bis zu 4 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur ergaben sich keine Unterschiede >10 % im Vergleich zum Ausgangswert. Der Ausgangswert wurde als technisches Duplikat gemessen. Die weiteren Messungen erfolgten als Einfachmessung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm 1 Standardabweichung (n=24).

3.1.2 Langfristige Probenstabilität bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen

In Abbildung 2 sind die MW der relativen MIA Konzentrationen, bezogen auf den Ausgangswert, nach langfristiger (maximal 14 Tage) Lagerung bei Raumtemperatur, Kühlschranks Temperatur (4-6 °C) und -20 °C graphisch dargestellt.

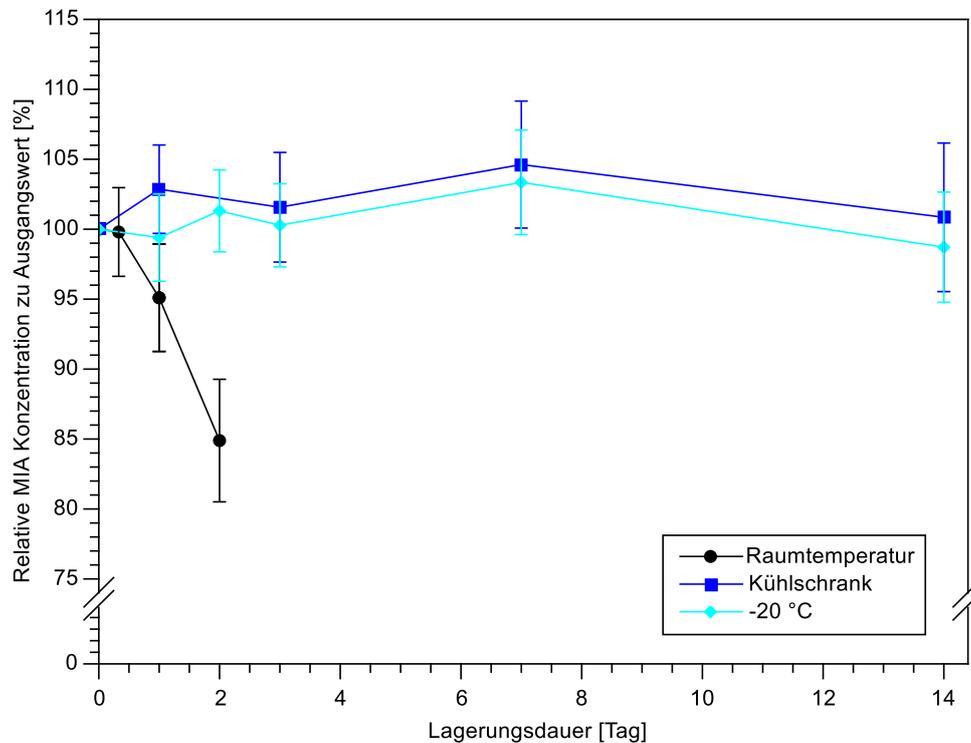


Abbildung 2: Auf den Ausgangswert (Zeitpunkt null) normalisierte relative MIA Konzentrationen nach langfristiger Probenlagerung bei Raumtemperatur, Kühlschranks Temperatur (4-6 °C) und -20 °C. Nach 2 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur ergab sich ein Abfall der relativen MIA Konzentration auf <90 % des Ausgangswerts. Nach bis zu 14 Tagen Lagerung bei Kühlschranks Temperatur und -20 °C ergaben sich keine Unterschiede >10 % im Vergleich zum Ausgangswert. Der Ausgangswert wurde als technisches Duplikat gemessen. Die weiteren Messungen erfolgten als Einfachmessung. Dargestellt sind Mittelwerte ± 1 Standardabweichung (n=24).

Die Lagerung bei Raumtemperatur bewirkte nach 8 Stunden nur eine minimale Veränderung der relativen MIA Konzentration ($99,8 \pm 3,2$ %) im Vergleich zum Ausgangswert. Nach 1 Tag bei Raumtemperatur ließ sich jedoch ein Abfall der relativen MIA Konzentration auf $95,1 \pm 3,8$ % beobachten. Die relative Abweichung vom Ausgangswert betrug nach 1 Tag bei Raumtemperatur allerdings, auch unter Berücksichtigung der ± 1 Standardabweichung, nicht >10 % vom Ausgangswert. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur setzte sich die abfallende Tendenz mit einer relativen MIA Konzentration von $84,9 \pm 4,4$ % fort, wodurch die definierte Grenze einer >10 % Abweichung vom Ausgangswert erreicht wurde.

In gepaarten t-Tests war der MW der absoluten MIA Konzentration nach 2 Tagen bei Raumtemperatur (853 ± 196 pg/ml) signifikant niedriger als zum Ausgangszeitpunkt (1003 ± 215 pg/ml) ($p < 0,001$), sowie signifikant niedriger als nach 2 Tagen bei -20 °C (1015 ± 211 pg/ml) ($p < 0,001$).

Die Lagerung bei Kühlschrank Temperatur ($4-6$ °C) ergab keine Abweichung des MW der relativen MIA Konzentration >10 % des Ausgangswerts. Nach 1 Tag ($102,9 \pm 3,2$ %), nach 3 Tagen ($101,6 \pm 3,9$ %), nach 7 Tagen ($104,6 \pm 4,5$ %) und nach 14 Tagen ($100,9 \pm 5,3$ %) bei Kühlschrank Temperatur ergaben sich nur geringfügige Erhöhungen der relativen MIA Konzentration.

Lagerung bei -20 °C ergab keine Abweichung des MW der relativen MIA Konzentration >10 % des Ausgangswerts. Verglichen mit der Lagerung bei Kühlschrank Temperatur fiel nach Lagerung bei -20 °C ein ähnlicher graphischer Verlauf der relativen MIA Konzentration auf. Nach 1 Tag ($99,4 \pm 3,1$ %), nach 2 Tagen ($101,3 \pm 2,9$ %) und nach 3 Tagen ($100,3 \pm 3,0$ %) Lagerung bei -20 °C lag die relative MIA Konzentration nahe der Ausgangskonzentration. Auch nach 7 Tagen ($103,4 \pm 3,7$ %) und nach 14 Tagen ($98,7 \pm 3,9$ %) bei -20 °C war die relative MIA Konzentration kaum verändert.

3.1.3 Stabilität nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen

Die Messergebnisse der MIA Konzentrationen vor und nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die MIA Konzentrationen lagen vor den Einfrier-Auftau Zyklen zwischen $618-1578$ pg/ml und nach den Einfrier-Auftau Zyklen zwischen $572-1523$ pg/ml. Nach den Einfrier-Auftau Zyklen zeigte Probe 15 mit einer relativen MIA Konzentration von $116,2$ % des Ausgangswerts den höchsten prozentualen Konzentrationsanstieg, wohingegen Probe 9 mit einer relativen MIA Konzentration von $92,6$ % des Ausgangswerts den stärksten prozentualen Konzentrationsabfall aufwies.

Tabelle 2: Absolute MIA Konzentrationen vor und nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen (EA). Zusätzlich wurden die MIA Konzentrationen nach EA in Relation zu den MIA Konzentrationen vor EA dargestellt. Die Konzentrationen vor EA wurden als technisches Duplikat gemessen und der Mittelwert dargestellt. Die Messungen nach EA erfolgten als Einfachmessung.

Proben- nummer	MIA vor EA [pg/ml]	MIA nach EA [pg/ml]	MIA nach EA / MIA vor EA [%]
1	807	823	102,0
2	1306	1334	102,1
3	903	910	100,8
4	776	800	103,2
5	1062	1100	103,6
6	1048	1106	105,6
7	1012	1027	101,5
8	1016	1042	102,6
9	618	572	92,6
10	893	917	102,8
11	1062	1072	101,0
12	987	995	100,8
13	911	952	104,6
14	957	996	104,0
15	1034	1202	116,2
16	768	795	103,5
17	955	910	95,3
18	1098	1026	93,4
19	990	960	96,9
20	882	903	102,3
21	1074	1094	101,9
22	1499	1523	101,6
23	1578	1516	96,1
24	845	819	96,8

Zur visuellen Beurteilung der relativen Differenzen der MIA Konzentrationen vor und nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen wurde ein Bland-Altman-Diagramm erstellt (Abbildung 3). Hier waren die relativen Differenzen tendenziell vermehrt im leicht positiven Bereich wiederzufinden. Im Mittel waren die MIA Konzentrationen nach den Einfrier-Auftau Zyklen gegenüber den Messungen vor den Einfrier-Auftau Zyklen um 1 % erhöht. Visuell auffällig war im Bland-Altman-Diagramm außerdem ein Ausreißer der relativen Differenz in positive Richtung durch Probe 15.

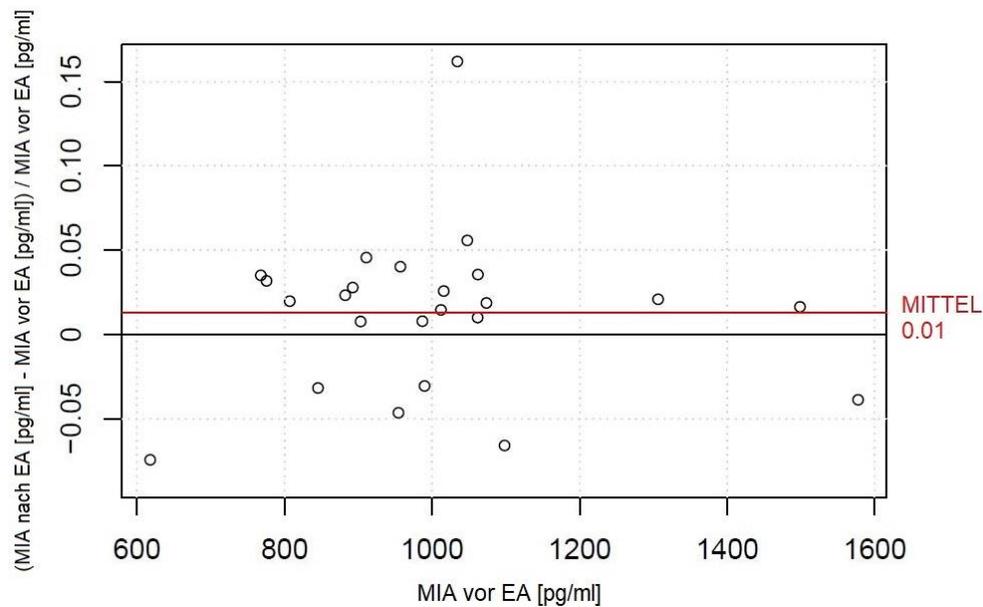


Abbildung 3: Bland-Altman-Diagramm zur Beurteilung der relativen Differenzen der MIA Konzentrationen vor und nach wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen (EA) (n=24). Im Mittel waren die MIA Konzentrationen nach EA gegenüber den Messungen vor EA um 1 % erhöht. Die Konzentrationen vor EA wurden als technisches Duplikat gemessen und der Mittelwert verwendet. Die Messungen nach EA erfolgten als Einfachmessung.

Nachfolgend sollte beurteilt werden ob es sich bei der Tendenz zu erhöhten MIA Konzentrationen nach den Einfrier-Auftau Zyklen um ein statistisch signifikantes Phänomen handelt. Der MD der MIA Konzentrationen lag nach den Einfrier-Auftau Zyklen (995 pg/ml) etwas höher als der MD der MIA Konzentrationen vor den Einfrier-Auftau Zyklen (988 pg/ml). Der Unterschied war jedoch im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test nicht statistisch signifikant ($p=0,271$).

3.1.4 Interferenz durch Hämolyse

Um Interferenzen durch Hämolyse zu untersuchen, wurden gepoolte Serumproben mit selbst hergestellten Hämolysat in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und anschließend die MIA Konzentration bestimmt, um Messabweichungen zu erkennen (siehe Abschnitt 2.3.1). In Tabelle 3 sind die Messergebnisse dieses Hämolyse Spike-Versuchs dargestellt. Erkennbar sind unterschiedliche Ausgangskonzentrationen des freien Hämoglobins zwischen 68-193 mg/l in den vier Proben nach Spike mit NaCl 0,9 %. Nach Spike mit dem Hämolysat stiegen die freien Hämoglobin Konzentrationen schrittweise planungsgemäß an. Die höchste untersuchte Konzentration des freien Hämoglobins betrug 4605 mg/l bei Probe 4. Die relativen MIA Konzentration unterschieden sich bei steigender Konzentration des freien Hämoglobins nicht ≥ 10 % verglichen mit dem NaCl 0,9 % Spike. Mit 91,1 % wurde die

niedrigste relative MIA Konzentration, bezogen auf den Spike mit NaCl 0,9 %, bei Probe 1 und einer freien Hämoglobin Konzentration von 1652 mg/l gemessen. Die höchste relative MIA Konzentration, bezogen auf den Spike mit NaCl 0,9 %, wurde bei Probe 4 mit 102,5 % gemessen.

Tabelle 3: Absolute MIA Konzentrationen und auf den Spike mit NaCl 0,9 % normalisierte relative MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Hämolysaten. Dargestellt sind Einfachmessungen.

Proben- nummer	Freies Hämoglobin [mg/l]	Absolute MIA Konzentration [pg/ml]	Relative MIA Konzentration zu NaCl 0,9 % Spike [%]
1	68 (NaCl 0,9 % Spike)	1509	100,0
	879	1415	93,8
	1652	1374	91,1
	3095	1523	101,0
	4545	1390	92,1
2	111 (NaCl 0,9 % Spike)	911	100,0
	705	906	99,5
	1732	872	95,8
	3090	871	95,6
	4495	865	95,0
3	122 (NaCl 0,9 % Spike)	751	100,0
	683	748	99,5
	1776	741	98,6
	3230	748	99,5
	4565	762	101,4
4	193 (NaCl 0,9 % Spike)	775	100,0
	764	782	100,9
	1894	795	102,5
	3225	778	100,3
	4605	787	101,5

Zusätzlich erfolgte in Abbildung 4 eine graphische Darstellung der absoluten MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Hämolysaten. Es ist erkennbar, dass die vier Proben bereits nach Spike mit NaCl 0,9 %, und somit bei den niedrigsten freien Hämoglobin Konzentrationen, unterschiedliche MIA Konzentrationen aufwiesen. Probe 1 hatte durchwegs das höchste MIA Konzentration Niveau. Bei Probe 1 fielen außerdem die Schwankungen der MIA Konzentration bei steigender Konzentration des freien Hämoglobins tendenziell etwas stärker aus. Beispielsweise betrug für Probe 1 die niedrigste MIA Konzentration 1374 pg/ml bei einer freien Hämoglobin Konzentration von 1652 mg/l, wohingegen die höchste MIA

Konzentration 1523 pg/ml bei einer freien Hämoglobin Konzentration von 3095 mg/l betrug.

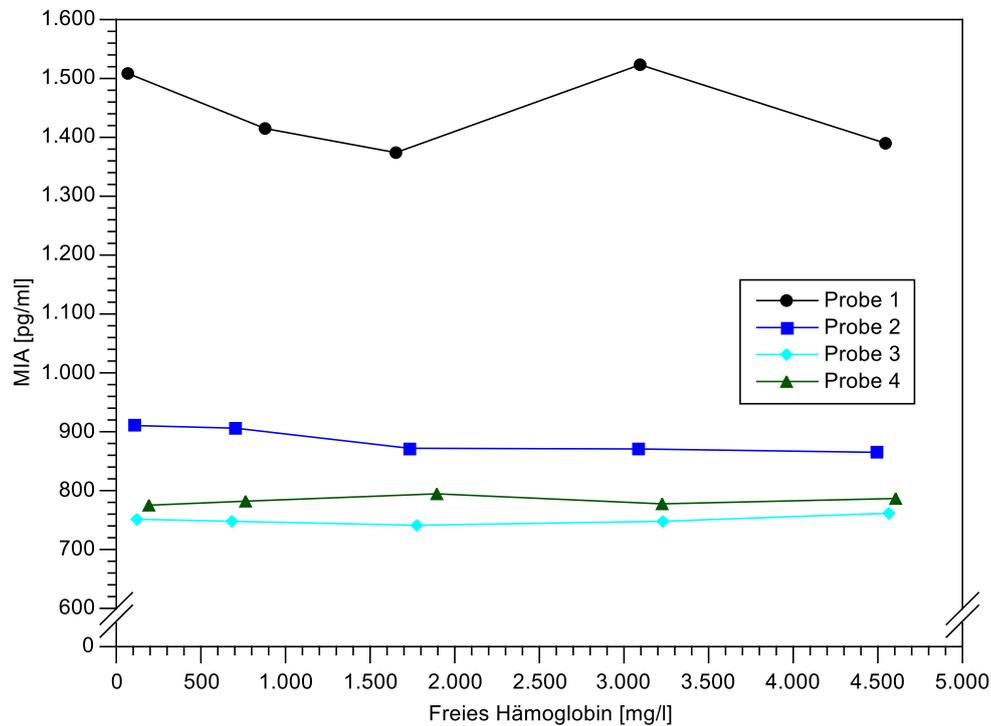


Abbildung 4: Absolute MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Hämolysaten. Als Ausgangswert diente ein Spike mit NaCl 0,9 %. Insgesamt zeigte sich keine Tendenz zu abweichenden MIA Konzentrationen bei steigenden Konzentrationen des freien Hämoglobins. Die dargestellten Messungen erfolgten als Einfachmessung.

Die Proben 2-4 hatten insgesamt niedrigere MIA Konzentrationen, die auch bei ansteigenden Konzentrationen des freien Hämoglobins kaum schwankten. Insgesamt konnte keine Tendenz zu abweichenden MIA Konzentrationen nach Zugabe des Hämolysats festgestellt werden.

3.1.5 Interferenz durch Ikterie

Um Interferenzen durch ikterische Proben zu untersuchen, wurden gepoolte Serumproben mit direktem Bilirubin Standard in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und anschließend die MIA Konzentration bestimmt, um Messabweichungen zu erkennen (siehe Abschnitt 2.3.2). In Tabelle 4 sind die Messergebnisse dieses Ikterie Spike-Versuchs dargestellt. Die Ausgangskonzentrationen des direkten Bilirubins lagen in allen vier Proben nach Spike mit Aqua in einem Bereich bis maximal 0,2 mg/dl. Nach Spike mit den unterschiedlich konzentrierten Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz Lösungen zeigte sich ein planungsgemäßer Anstieg der Konzentration

des direkten Bilirubins. Dabei betrug die höchste untersuchte Konzentration des direkten Bilirubins 43,9 mg/dl bei Probe 7. Die relativen MIA Konzentrationen schwankten bei steigenden Konzentrationen des direkten Bilirubins zwischen 115,2 % (Probe 5, direktes Bilirubin = 6,2 mg/dl) und 94,8 % (Probe 6, direktes Bilirubin = 2,9 mg/dl) der MIA Konzentration des Spikes mit Aqua.

Tabelle 4: Absolute MIA Konzentrationen und auf den Spike mit Aqua normalisierte relative MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz Lösungen. Dargestellt sind Einfachmessungen.

Proben- nummer	Direktes Bilirubin [mg/dl]	Absolute MIA Konzentration [pg/ml]	Relative MIA Konzentration zu Aqua Spike [%]
5	< 0,1 (Aqua Spike)	861	100,0
	0,3	939	109,1
	3,2	932	108,2
	6,2	991	115,2
	19,2	949	110,2
	41,7	909	105,6
6	0,1 (Aqua Spike)	651	100,0
	0,3	701	107,6
	2,9	617	94,8
	6,1	634	97,3
	18,7	650	99,8
	41,4	660	101,4
7	0,2 (Aqua Spike)	1404	100,0
	0,4	1374	97,8
	3,3	1372	97,7
	6,7	1466	104,4
	19,8	1386	98,7
	43,9	1437	102,3
8	0,2 (Aqua Spike)	952	100,0
	0,4	947	99,5
	3,5	929	97,5
	7,0	909	95,5
	20,8	929	97,5
	41,6	918	96,4

In Abbildung 5 sind zusätzlich die absoluten MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz Lösungen graphisch dargestellt.

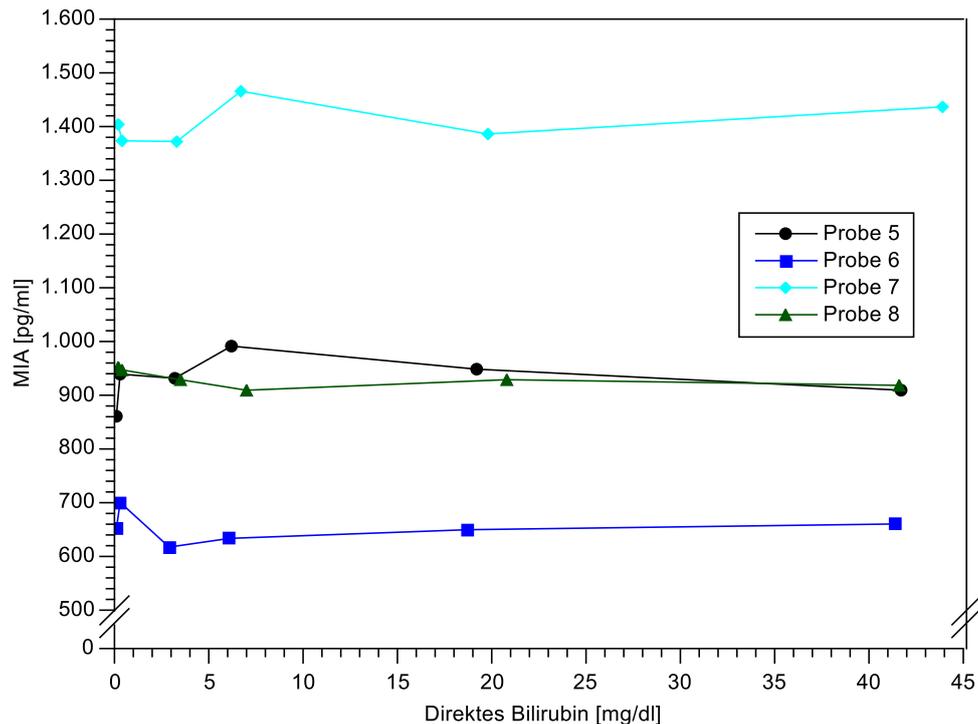


Abbildung 5: Absolute MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Bilirubinkonjugat Ditaurat Dinatriumsalz Lösungen. Als Ausgangswert diente ein Spike mit Aqua. Die MIA Konzentrationen schwankten bei steigenden Konzentrationen des direkten Bilirubins um den Ausgangswert. Die dargestellten Messungen erfolgten als Einfachmessung.

Es ist erkennbar, dass Probe 7 das höchste und Probe 6 das niedrigste MIA Konzentration Niveau aufwies. Das Niveau der MIA Konzentration von Probe 5 und Probe 8 lag zwischen den beiden anderen Proben. Mit steigenden direkten Bilirubin Konzentrationen schwankten die MIA Konzentrationen bei allen Proben um den Ausgangswert, wobei diese Schwankungen keinem erkennbaren Muster folgten.

3.1.6 Interferenz durch Lipämie

Um Interferenzen durch lipämische Proben zu untersuchen, wurden gepoolte Serumproben mit Lipofundin MCT 20 % in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und anschließend die MIA Konzentration bestimmt, um Messabweichungen zu erkennen (siehe Abschnitt 2.3.3). In Tabelle 5 sind die Messergebnisse dieses Lipämie Spike-Versuchs dargestellt. Es wurden unterschiedliche Triglyzerid Ausgangskonzentrationen zwischen 96-162 mg/dl in den vier Proben nach Spike mit Aqua festgestellt. Davon ausgehend stiegen die gemessenen Triglyzerid Konzentrationen nach Spike mit ansteigend konzentrierten Lipofundin MCT 20 % Emulsionen planungsgemäß an. Die höchste untersuchte Triglyzerid Konzentration betrug 4298 mg/dl bei Probe 10. Da für lipämische Proben eine schlechte Korrelation

zwischen Triglyzerid Konzentration und Proben­trübung beschrieben ist [67–69], wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Lipämie-Indices des cobas c503 Analysemoduls bestimmt. Diese Lipämie-Indices basieren auf Extinktionsmessungen und sollen helfen den Trübungsgrad besser einschätzen zu können [67–69]. Die parallele Begutachtung der am cobas c503 Analysemodul gemessenen Lipämie-Indices zeigte nach Spike mit ansteigend konzentrierten Lipofundin MCT 20 % Emulsionen entsprechend ansteigende Werte. Dabei lagen die gemessenen Lipämie-Indices im Bereich 10-884. Es bestand eine signifikant positive Korrelation zwischen der Triglyzerid Konzentration und dem Lipämie-Index ($p=0,986$; $p<0,001$; $n=24$). Die relativen MIA Konzentrationen schwankten bei steigenden Triglyzerid Konzentrationen zwischen 94,5-105,6 % der MIA Konzentration des Spikes mit Aqua, und wichen somit in keinem Fall ≥ 10 % vom Spike mit NaCl 0,9 % ab.

Tabelle 5: Absolute MIA Konzentrationen und auf den Spike mit Aqua normalisierte relative MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Lipofundin MCT 20 % Emulsionen. Dargestellt sind Einfachmessungen.

Proben- nummer	Triglyzeride [mg/dl]	Lipämie- Index	Absolute MIA Konzentration [pg/ml]	Relative MIA Konzentration zu Aqua Spike [%]
9	96 (Aqua Spike)	10	886	100,0
	150	20	869	98,1
	354	58	905	102,2
	598	102	888	100,3
	2287	423	882	99,6
	4087	809	891	100,6
10	162 (Aqua Spike)	10	841	100,0
	217	20	827	98,3
	417	61	795	94,5
	668	114	832	98,9
	2320	447	805	95,8
	4298	884	832	98,9
11	159 (Aqua Spike)	11	895	100,0
	213	23	850	95,0
	416	61	862	96,3
	673	122	862	96,3
	2254	420	890	99,4
	4229	847	874	97,7
12	161 (Aqua Spike)	14	827	100,0
	219	23	870	105,3
	425	63	829	100,3
	665	120	873	105,6
	2388	453	807	97,6
	4284	858	794	96,0

In Abbildung 6 sind zusätzlich die absoluten MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Lipofundin MCT 20 % Emulsionen graphisch dargestellt.

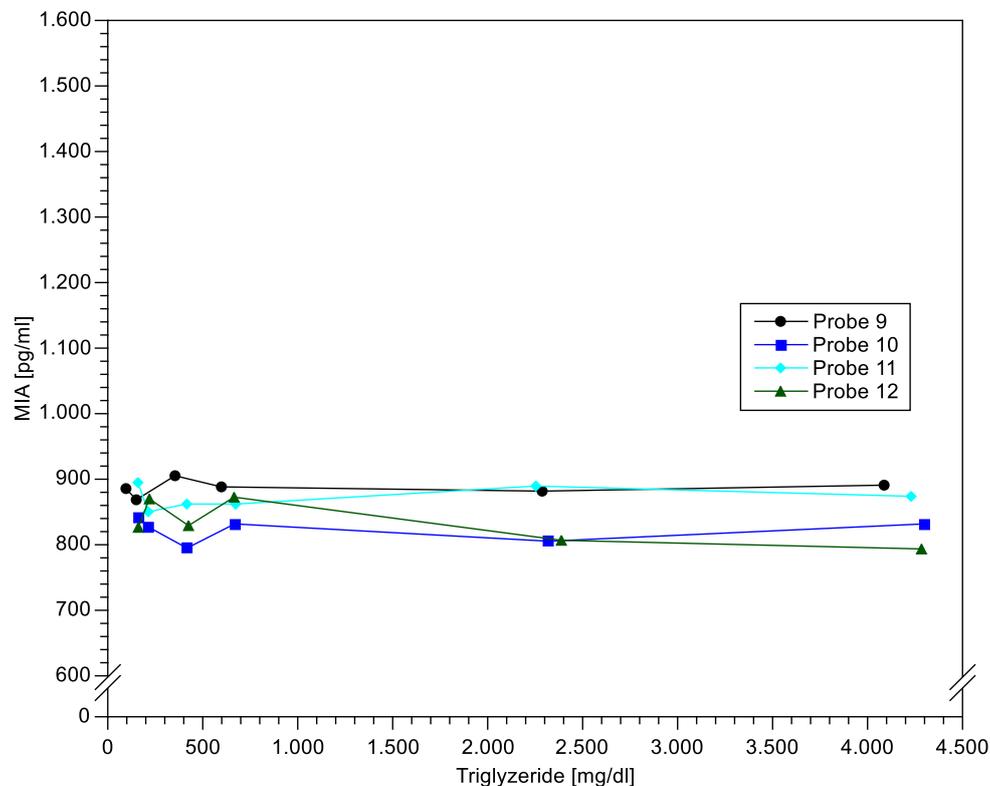


Abbildung 6: Absolute MIA Konzentrationen nach Spike mit unterschiedlich konzentrierten Lipofundin MCT 20 % Emulsionen. Als Ausgangswert diente ein Spike mit Aqua. Insgesamt zeigte sich keine Tendenz zu abweichenden MIA Konzentrationen bei steigenden Triglyzerid Konzentrationen. Die dargestellten Messungen erfolgten als Einfachmessung.

Die Serum MIA Konzentrationen lagen in diesem Versuch bei allen vier Proben auf einem ähnlichen Niveau zwischen 794-905 pg/ml. Mit steigenden Triglyzerid Konzentrationen schwankten die MIA Konzentrationen bei allen Proben leicht um den Ausgangswert, wobei diese Schwankungen keinem erkennbaren Muster folgten. Insgesamt konnte keine Tendenz zu abweichenden MIA Konzentrationen nach Zugabe der Lipofundin MCT 20 % Emulsion festgestellt werden.

3.2 Einflüsse des Testverfahrens auf die Messung der MIA Konzentration

Zunächst sollten die analytischen Leistungsmerkmale der Präzision und Richtigkeit des R&D MIA ELISA erfasst werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Intra- und Inter-Assay Präzision und Richtigkeit des Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA) unter Verwendung 6 gepoolter Serum Proben und der drei Quantikine ELISA Kit Controls (R&D Systems Inc., USA). Intra-Assay Ergebnisse basieren auf MIA Einfachmessungen (n=5) innerhalb eines Analysenlaufs. Inter-Assay Ergebnisse basieren auf MIA Einfachmessungen (Serum Proben) (n=5) bzw. Mittelwerten aus Duplikaten (Kontrollen) (n=12) verschiedener Analysenläufe. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, VK=Variationskoeffizient.

	Serum Probe						Kontrolle		
	1	2	3	4	5	6	Niedrig	Mittel	Hoch
Intra-Assay MW [pg/ml]	523	574	1183	1158	2279	2224	182	341	664
Intra-Assay SD [pg/ml]	10,2	7,9	26,0	26,9	38,3	80,9	8,1	6,2	31,7
Intra-Assay VK [%]	1,9	1,4	2,2	2,3	1,7	3,6	4,5	1,8	4,8
Intra-Assay relative Unrichtigkeit [%]							10,2	6,2	5,5
Inter-Assay MW [pg/ml]	537	588	1219	1214	2293	2236	180	339	655
Inter-Assay SD [pg/ml]	35,1	30,3	41,9	45,7	66,9	105,4	10,1	13,0	24,1
Inter-Assay VK [%]	6,5	5,1	3,4	3,8	2,9	4,7	5,6	3,8	3,7
Inter-Assay relative Unrichtigkeit [%]							9,0	5,6	4,1

Hierzu wurden 6 gepoolte Serum Proben und die drei Quantikine ELISA Kit Controls verwendet. Die Serum Proben lagen planungsgemäß auf drei unterschiedlichen MIA Konzentrationsniveaus. Eine fünffache MIA Konzentrationsbestimmung dieser Serum Proben innerhalb eines Analysenlaufs erbrachte Intra-Assay Variationskoeffizienten von 1,4-3,6 %. Für die drei Kontrollen lagen die Intra-Assay Variationskoeffizienten bei 1,8-4,8 % (n=5) und die relative Unrichtigkeit bei 5,5-10,2 % (n=5).

Zwischen verschiedenen Analysenläufen erbrachten die Messungen der Serum Proben Inter-Assay Variationskoeffizienten von 2,9-6,5 % (n=5). Für die drei Kontrollen lagen die Inter-Assay Variationskoeffizienten bei 3,7-5,6 % (n=12) und die relative Unrichtigkeit bei 4,1-9,0 % (n=12).

Die relative Unrichtigkeit der Kontrollen war sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Analysenläufen für die niedrige Kontrolle am stärksten ausgeprägt, und fiel mit steigenden MIA Konzentrationen der Kontrollen schrittweise ab. An 1 von 12 Inter-Assay Analysenläufen lag die mittlere MIA Konzentration der niedrigen Kontrolle mit 208 pg/ml leicht oberhalb des herstellerseitigen Zielbereichs

(± 3 Standardabweichungen: 125-204 pg/ml). Ansonsten lagen alle Kontrollmessungen innerhalb der herstellerseitigen Zielbereiche.

Nachfolgend sollte ein Vergleich zu dem ebenfalls kommerziell erhältlichen Roche MIA ELISA erfolgen, um testabhängige Unterschiede in der Quantifizierung der Serum MIA Konzentration zu untersuchen. In Tabelle 7 sind die vergleichend gemessenen Roche MIA Konzentrationen [pg/ml] und R&D MIA Konzentrationen [pg/ml] dargestellt. Die MIA Konzentrationen des Roche MIA ELISA lagen im Bereich 4500-14200 pg/ml (MD=9300 pg/ml; MW=9705 \pm 2606 pg/ml). Die MIA Konzentrationen des R&D MIA ELISA lagen im Bereich 770-1677 pg/ml (MD=1231 pg/ml; MW=1212 \pm 256 pg/ml).

Tabelle 7: Serum MIA Konzentrationen der vergleichenden Messungen des R&D (Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA)) und Roche (human MIA ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland)) ELISA (n=19). Dargestellt sind Einfachmessungen.

Probennummer	Roche MIA [pg/ml]	R&D MIA [pg/ml]
1	9300	1086
2	12100	1296
3	8600	1217
4	14200	1677
5	8700	1038
6	5500	770
7	10700	1231
8	7000	909
9	8000	985
10	11400	1327
11	4500	827
12	8500	1009
13	12200	1367
14	13400	1628
15	7700	1146
16	12200	1490
17	8900	1252
18	10200	1285
19	11300	1494

Die vergleichend gemessenen Roche und R&D MIA Konzentrationen wurden zusätzlich in einem Streudiagramm graphisch dargestellt, wobei sich bereits visuell ein linearer Zusammenhang zeigte (Abbildung 7). Die Untersuchung der Pearson Produkt-Moment Korrelation zeigte, dass die R&D MIA Konzentration [pg/ml] signifikant positiv mit der Roche MIA Konzentration [pg/ml] korrelierte ($r=0,938$; $p<0,001$; $n=19$). In Abbildung 7 ist außerdem die Passing-Bablok-Regressionsgerade visuell dargestellt. Die Messungen verteilen sich ohne starke Ausreißer um diese Regressionsgerade.

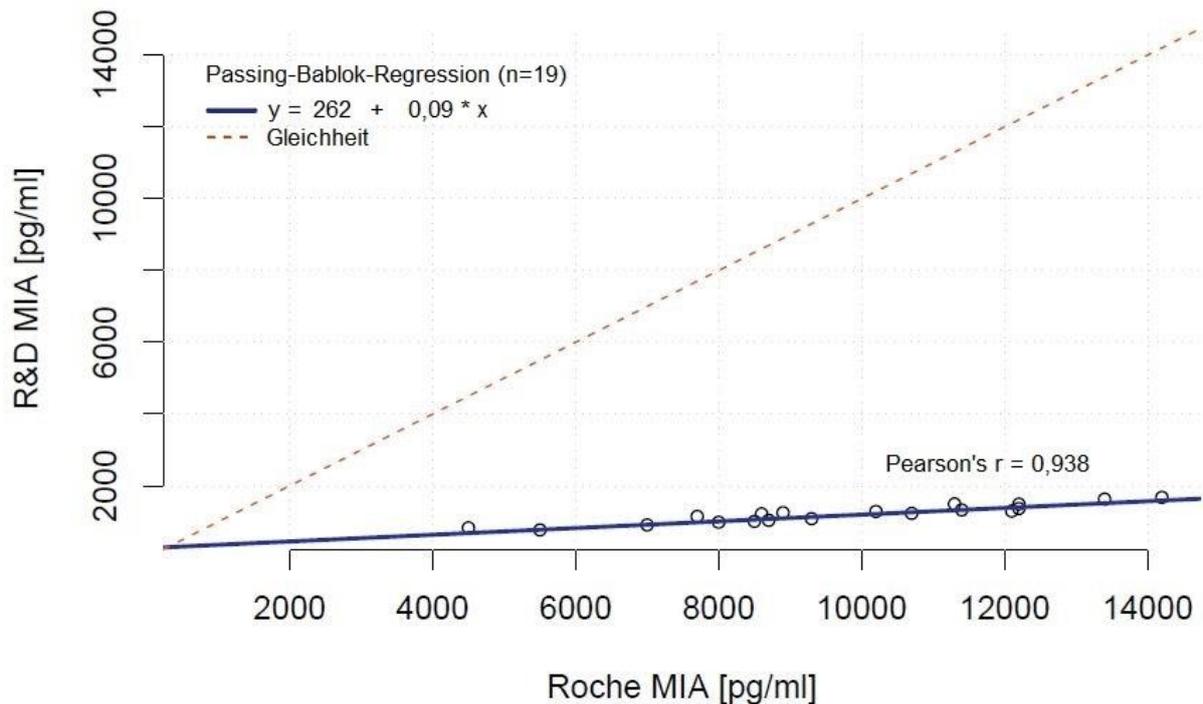


Abbildung 7: Streudiagramm und Passing-Bablok-Regression der vergleichend mittels R&D (Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA)) und Roche (human MIA ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland)) ELISA bestimmten Serum MIA Konzentrationen (n=19). Die R&D und Roche MIA Konzentrationen korrelierten signifikant positiv ($r=0,938$; $p<0,001$). Die Passing-Bablok-Regression wird durch die Formel $R\&D\ MIA\ [pg/ml] = 262\ pg/ml + 0,09 * (Roche\ MIA\ [pg/ml])$ beschrieben.

Durch Passing-Bablok-Regression konnte die Formel der Regressionsgerade mit $R\&D\ MIA\ [pg/ml] = 262\ pg/ml + 0,09 * (Roche\ MIA\ [pg/ml])$ bestimmt werden. Das 95 % Konfidenzintervall (KI) des Achsenabschnitts betrug 128-444 pg/ml. Das 95 % KI der Steigung betrug 0,077-0,112.

Auffallend ist zudem die deutlich unterschiedliche Wertelage der gemessenen MIA Konzentrationen in Abhängigkeit des verwendeten MIA ELISA. So verläuft die Passing-Bablok-Regressionsgerade mit der Steigung 0,09 deutlich flacher als die Gleichheitsgerade, was zeigt, dass der Roche MIA ELISA im untersuchten Konzentrationsbereich deutlich höhere MIA Konzentrationen misst als der R&D MIA ELISA. Um diese Erkenntnis weiter zu visualisieren erfolgte eine ergänzende Darstellung im Bland-Altman-Diagramm (Abbildung 8).

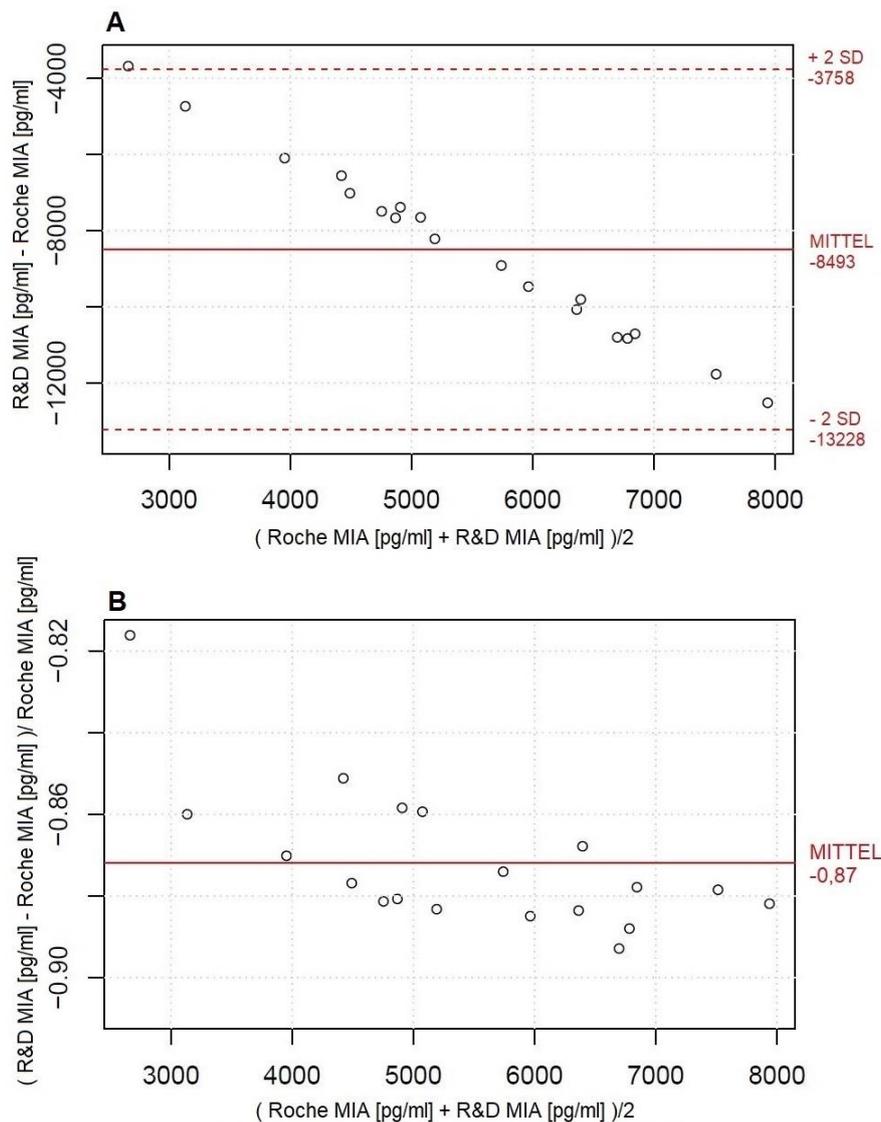


Abbildung 8: Bland-Altman-Diagramm mit absoluten (A) und relativen (B) Differenzen der mittels R&D (Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA)) und Roche (human MIA ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland)) ELISA bestimmten Serum MIA Konzentrationen gegenüber der gemittelten MIA Konzentration beider Tests (n=19). Im Mittel lagen die Roche MIA Konzentrationen 8493 pg/ml (A), beziehungsweise 87 % (B), über den R&D MIA Konzentrationen. Die absoluten und relativen Differenzen erhöhten sich im untersuchten Konzentrationsbereich tendenziell linear mit steigenden gemittelten MIA Konzentrationen.

Im Bland-Altman-Diagramm lagen die Roche MIA Konzentrationen im Mittel 8493 pg/ml, beziehungsweise 87 %, über den R&D MIA Konzentrationen. Zudem erhöhten sich im untersuchten Konzentrationsbereich die absoluten Differenzen mit steigenden gemittelten MIA Konzentrationen linear (Abbildung 8: A). Zur weiteren Beurteilung wurde das Bland-Altman-Diagramm mit relativen Differenzen herangezogen (Abbildung 8: B). Auch hier zeigte sich, in geringerer Ausprägung, eine lineare Tendenz zu höheren relativen Differenzen mit steigenden gemittelten MIA

Konzentrationen. Um die beiden Methoden auch im Bereich extrem hoher MIA Konzentrationen zu vergleichen wurde außerdem eine einzelne Probe mit extrem hoher MIA Konzentration mit beiden MIA ELISA einmalig gemessen. Es wurde Roche MIA = 798400 pg/ml und R&D MIA = 85505 pg/ml bestimmt. Bei dieser extrem hohen MIA Konzentration lag die Roche MIA Konzentration somit 89 % über der R&D MIA Konzentration, und dementsprechend in der gleichen Größenordnung wie im niedrigeren Wertebereich.

3.3 Indirekt bestimmte laborinterne Serum MIA Referenzbereiche

3.3.1 Deskriptive Statistik des laborinternen Serum MIA Datensatzes

Die deskriptive Statistik des zur indirekten MIA Referenzbereich Berechnung verwendeten Datensatzes ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der laborintern im Zeitraum 05.09.2018-06.04.2022 mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA) bestimmten Serum MIA Konzentrationen. Für jede gemessene Person wurde lediglich die erste gemessene MIA Konzentration verwendet. Es wurden nur Personen im Alter ≥ 18 Jahre eingeschlossen. SD=Standardabweichung.

Geschlecht	Alter [Jahre]	N	MIA Modus [pg/ml]	MIA Mittelwert [pg/ml]	MIA Median [pg/ml]	MIA SD [pg/ml]	MIA Minimum [pg/ml]	MIA Maximum [pg/ml]
alle	≥ 18	2147	875	1152	932	2332	145	71553
männlich	≥ 18	1079	886	1129	936	1940	145	56386
weiblich	≥ 18	1068	860	1176	930	2671	221	71553

Der Gesamtdatensatz bestand aus N=2147 erstmaligen MIA Konzentrationsmessungen bei Personen ≥ 18 Jahre. Davon wurden 1079 Messungen (50,3 %) bei männlichen Personen und 1068 Messungen (49,7 %) bei weiblichen Personen durchgeführt. Der MD der MIA Konzentration lag im Gesamtdatensatz bei 932 pg/ml. Zwischen männlichen (936 pg/ml) und weiblichen (930 pg/ml) Personen bestand nur ein geringfügiger Unterschied der medianen MIA Konzentration. Im Gesamtdatensatz lag die niedrigste gemessene MIA Konzentration bei 145 pg/ml, wohingegen die höchste gemessene MIA Konzentration 71553 pg/ml betrug.

In einer graphischen Darstellung der Altersverteilung der MIA Konzentrationsmessungen (Abbildung 9) war erkennbar, dass im Anfangs- und Endbereich des eingeschlossenen Alters tendenziell weniger MIA Konzentrationsmessungen vorlagen. Eine Ausnahme bildeten 11 Messungen bei männlichen Person im Alter von 19 Jahren, wodurch graphisch im Anfangsbereich

eine Spitze imponierte. Der Großteil der Messungen wurde bei beiden Geschlechtern im Alter zwischen 45 und 80 Jahren durchgeführt. Ungefähr ab dem 80. Lebensjahr kam es zu einem raschen Abfall der Anzahl an MIA Konzentrationsmessungen. Es bestanden leichte Altersunterschiede zwischen Gesamtdatensatz (MD=63 Jahre; MW=62 ± 15 Jahre), männlichem Datensatz (MD=65 Jahre; MW=63 ± 14 Jahre) und weiblichem Datensatz (MD=60 Jahre; MW=60 ± 15 Jahre).

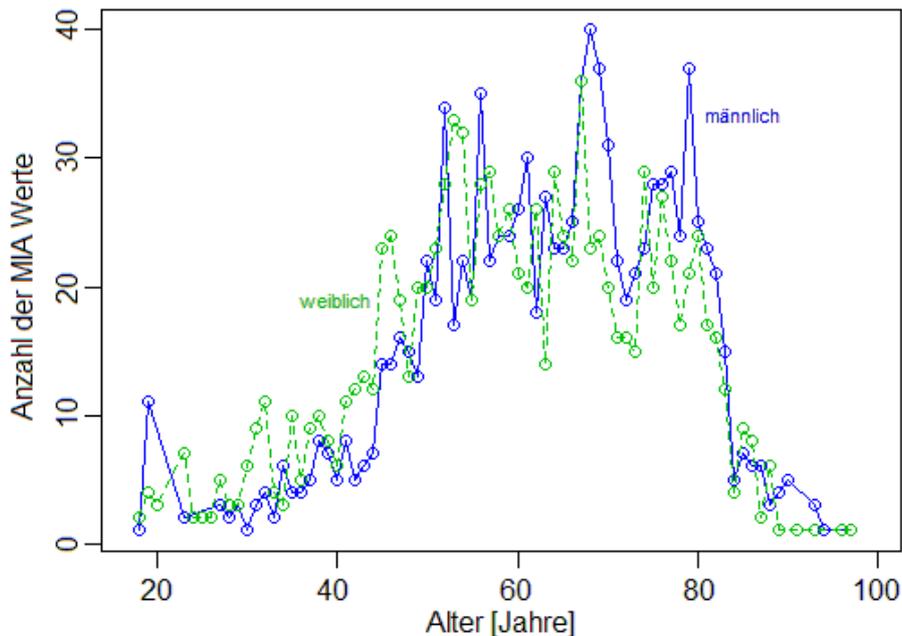


Abbildung 9: Altersverteilung der laborinternen Serum MIA Konzentrationsmessungen im Zeitraum 05.09.2018-06.04.2022 für weibliche (grün) (N=1068) und männliche (blau) (N=1079) Personen ≥ 18 Jahre. Für jede gemessene Person wurde lediglich die erste gemessene MIA Konzentration verwendet. Der Großteil der Messungen wurde bei beiden Geschlechtern im Alter zwischen 45 und 80 Jahren durchgeführt.

Es folgte eine visuelle Prüfung des Verlaufs der altersabhängigen 25., 50. und 75. Perzentile der MIA Konzentration (Abbildung 10). Dabei ließ sich visuell keine Tendenz zu einer Altersabhängigkeit der medianen MIA Konzentration erkennen. Im Anfangs- und Endbereich des eingeschlossenen Alters ließen sich jedoch bei geringen Fallzahlen stärkere Schwankungen der 25., 50. und 75. Perzentile feststellen, wodurch in diesen Altersgruppen eine Aussage zur Altersabhängigkeit eingeschränkt ist.

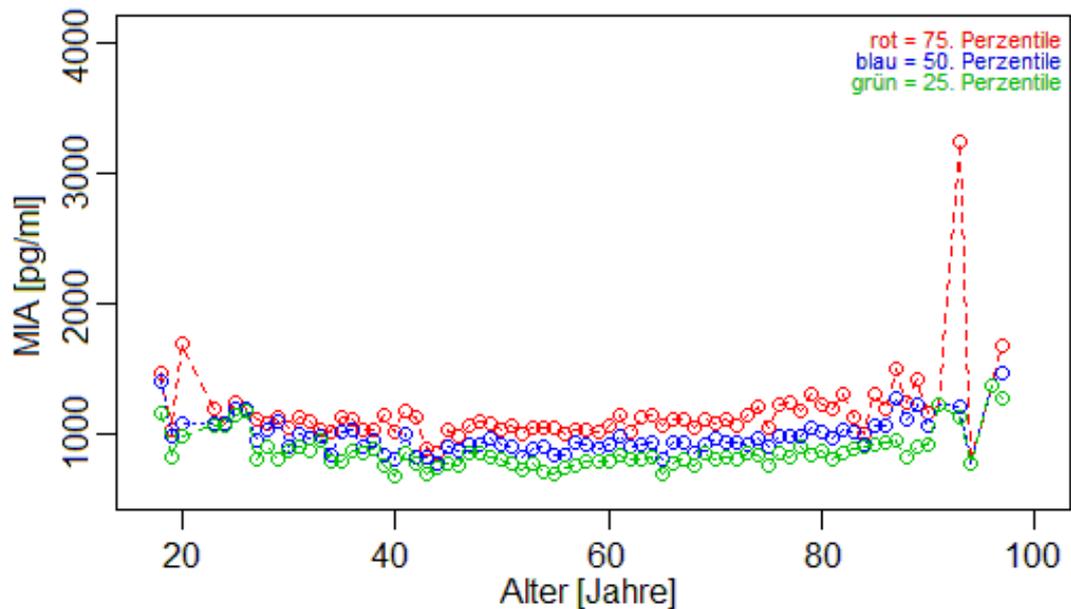


Abbildung 10: 25. Perzentile (grün), 50. Perzentile (blau) und 75. Perzentile (rot) der Serum MIA Konzentration in Abhängigkeit vom Alter. Erfasst sind Messungen männlicher und weiblicher Personen ≥ 18 Jahre im Zeitraum 05.09.2018-06.04.2022 (N=2147). Für jede gemessene Person wurde lediglich die erste gemessene MIA Konzentration verwendet. Es ließ sich visuell keine Altersabhängigkeit der medianen MIA Konzentration erkennen, wobei im Anfangs- und Endbereich des eingeschlossenen Alters bei geringen Fallzahlen stärkere Schwankungen der Perzentilen auftraten.

Um die Frage nach einer Altersabhängigkeit der MIA Konzentration statistisch zu untersuchen, erfolgte ergänzend eine Einteilung des gesamten Datensatzes in die Altersgruppen 18-30 Jahre (n=62), 31-60 Jahre (n=915) und >60 Jahre (n=1170). Die Einteilung in diese Altersgruppen sollte eine gute Vergleichbarkeit mit einer vorausgehenden Publikation ermöglichen, in der ähnliche Altersgruppen gebildet wurden [9]. Die MIA Konzentrationen betragen in den Altersgruppen 18-30 Jahre (MD=1061 pg/ml; MW=1058 \pm 34 pg/ml), 31-60 Jahre (MD=898 pg/ml; MW=1053 \pm 81 pg/ml) und >60 Jahre (MD=957 pg/ml; MW=1235 \pm 67 pg/ml). Die Verteilung der MIA Konzentrationen unterschied sich im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Altersgruppen ($p < 0,001$). In den nachfolgenden Post-hoc-Tests ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen 18-30 Jahre und 31-60 Jahre ($p < 0,001$), sowie zwischen 31-60 Jahre und >60 Jahre ($p < 0,001$). Die Effektstärke wurde zwischen den Gruppen 18-30 Jahre und 31-60 Jahre mit $r = 0,12$ berechnet, und zwischen den Gruppen 31-60 Jahre und >60 Jahre mit $r = 0,14$. Zwischen den Altersgruppen 18-30 Jahre und >60 Jahre bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,305$).

3.3.2 Laborinterne Verteilungsmuster und indirekt bestimmte Referenzbereiche der Serum MIA Konzentration

Zunächst erfolgte eine graphische Darstellung der monatlichen MD der Serum MIA Konzentration über den gesamten Auswertungszeitraum um eine Beeinflussung der indirekten Referenzbereich Bestimmung durch Assay bedingte Verschiebungseffekte oder Veränderungen im Kollektiv der PatientInnen zu beurteilen (Abbildung 11). Dabei ließen sich Schwankungen des monatlichen MD und der angepassten Glättungskurve des monatlichen MD feststellen. Das 95 % KI der angepassten Glättungskurve lag im anfänglichen Abschnitt tendenziell über dem gesamt MD (MIA = 932 pg/ml) und wechselte gegen Ende 2019 in einen Bereich unterhalb des gesamt MD. Dieser Verlauf kann auf eine Chargenabhängigkeit oder Veränderungen im Kollektiv der PatientInnen hindeuten.

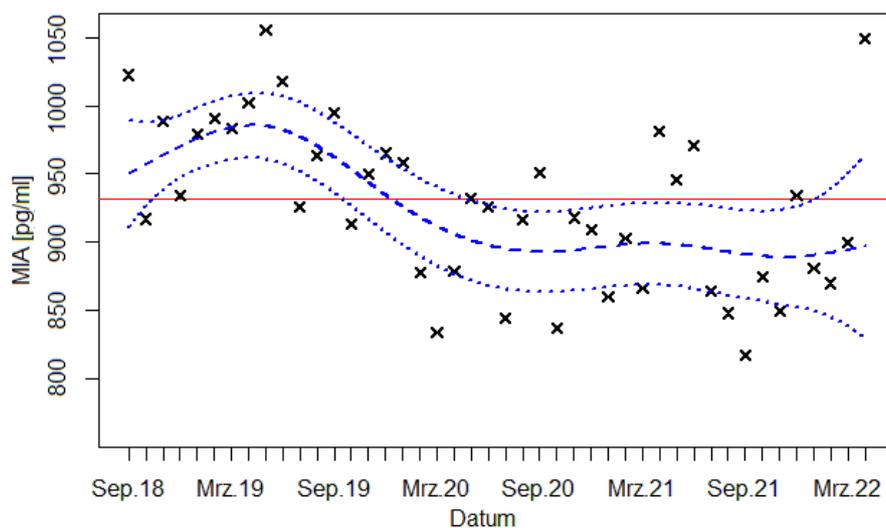


Abbildung 11: Darstellung des monatlichen Medians (MD) der Serum MIA Konzentration aller Personen im Alter ≥ 18 Jahre im Zeitraum 05.09.2018-06.04.2022 (N=2147). Die geschätzten Regressionskurven basieren auf einem verallgemeinerten additiven Modell. Über den gesamten Zeitraum konnten Schwankungen des monatlichen MD festgestellt werden. Schwarze Kreuze=monatlicher MD. Rote Linie=MD gesamt. Blaue gestrichelte Linie=angepasste Glättungskurve des monatlichen MD. Blaue gepunktete Linien=95 % Konfidenzintervall der angepassten Glättungskurve des monatlichen MD.

Nachfolgend wurde das Verteilungsmuster der erstmalig gemessenen Serum MIA Konzentrationen graphisch beurteilt (Abbildung 12). Es erfolgte sowohl die Darstellung des gesamten Verteilungsmusters (Abbildung 12 A) als auch der nach Geschlecht partitionierten Verteilungsmuster (Abbildung 12 B/C).

Im Gesamtdatensatz (Abbildung 12 A) zeigte die geschätzte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion eine linkssteile Verteilung. Ungefähr bei

MIA = 1200 pg/ml ließen sich im Abwärtsverlauf leichte Unregelmäßigkeiten erkennen, welche durch das RLE Programm als pathologische Werte geschätzt wurden (Abbildung 12 A - rote Kurve). Im weiteren Verlauf zeigte sich ungefähr bei MIA = 1600 pg/ml ein zusätzlicher niedrigerer Gipfel der ebenfalls als pathologisch eingestuft wurde. Die geschätzte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für nicht-pathologische Werte (Abbildung 12 A - grüne Kurve) orientierte sich erwartungsgemäß am Hauptgipfel der Verteilung.

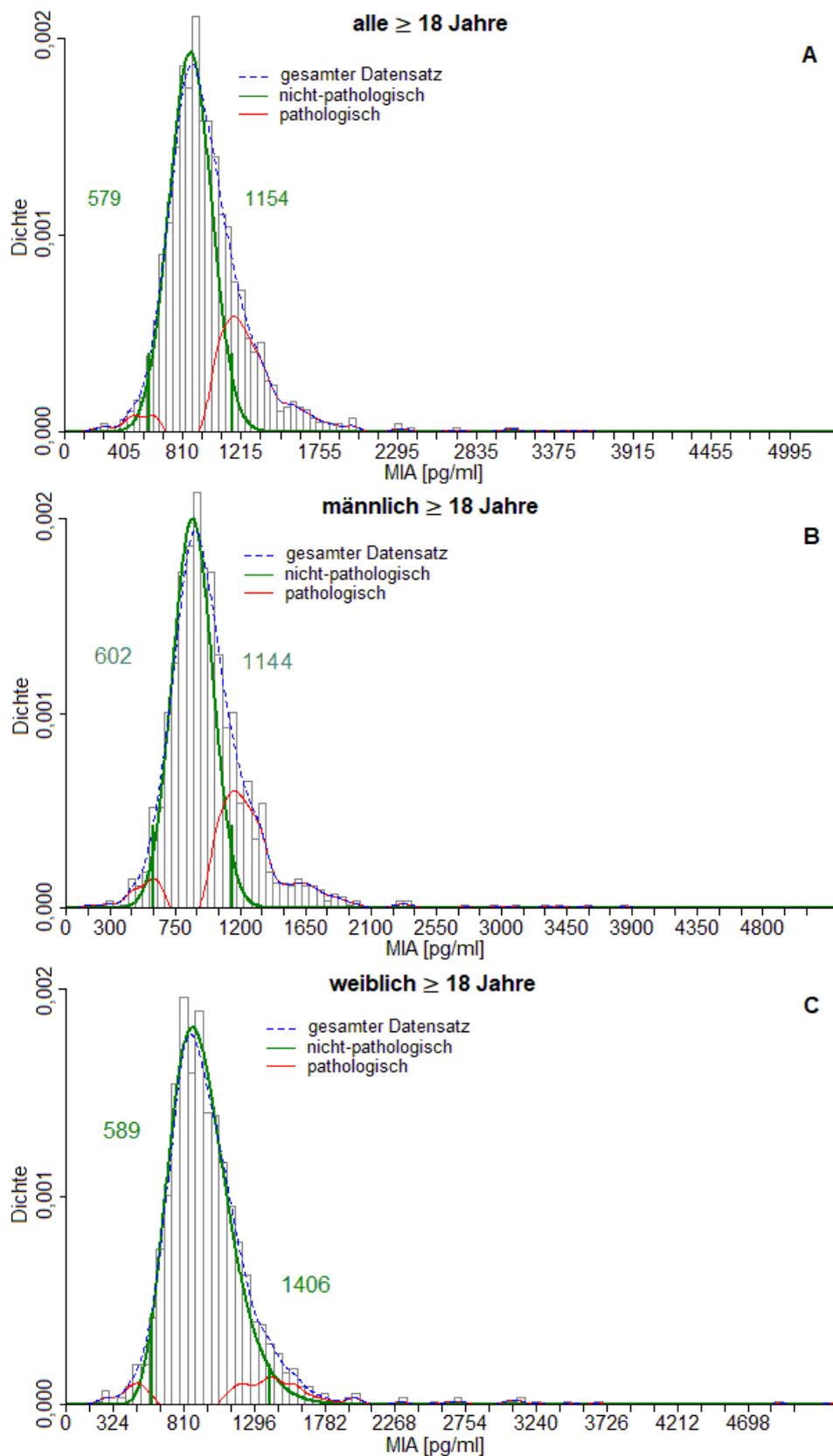


Abbildung 12: Geschätzte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für nicht-pathologische Werte (grüne Kurve), pathologische Werte (rote Kurve) und den gesamten Datensatz (blau gestrichelte Kurve) für alle (A) (N=2147), männliche (B) (N= 1079) und weibliche (C) (N=1068) Personen im Alter ≥ 18 Jahre. Die grünen Zahlen stellen die 2,5. und 97,5. Perzentile der geschätzten Verteilung nicht-pathologischer Werte dar.

Bei Messungen von Männern (Abbildung 12 B) zeigten die geschätzten Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen ähnliche Verläufe wie im Gesamtdatensatz. Dies war insbesondere daran erkennbar, dass in beiden Varianten Unregelmäßigkeiten im Abwärtsverlauf und ein zusätzlicher niedrigerer Gipfel ersichtlich waren.

Bei Frauen hingegen war der auf den Hauptgipfel folgende Abwärtsverlauf tendenziell gleichmäßiger (Abbildung 12 C). Ein zusätzlicher niedrigerer Gipfel konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Dementsprechend fiel auch die geschätzte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für pathologische Werte (Abbildung 12 C - rote Kurve) nicht so ausgeprägt aus wie im männlichen und gesamten Datensatz. Die geschätzte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für nicht-pathologische Werte (Abbildung 12 C - grüne Kurve) fiel jedoch bei der nach weiblichem Geschlecht partitionierten Variante breiter aus, wodurch die 97,5. Perzentile höher lag. Außerdem ließ sich visuell erkennen, dass bei der nach weiblichem Geschlecht partitionierten Variante die Verteilung der geschätzten nicht-pathologischen Werte leicht nach links verschoben war.

Die Ergebnisse der indirekt berechneten Serum MIA Referenzbereiche sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Indirekt berechnete laborinterne Referenzbereiche der mittels Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA) bestimmten Serum MIA Konzentration. KI=Konfidenzintervall. P=geschätzter Anteil nicht-pathologischer Werte an der gesamten Stichprobe.

Geschlecht	Alter [Jahre]	N	2,5. Perzentile MIA [pg/ml]	97,5. Perzentile MIA [pg/ml]	90% KI der 2,5. Perzentile [pg/ml]	90% KI der 97,5. Perzentile [pg/ml]	Modus [pg/ml]	P
alle	≥18	2147	579	1154	559-619	1120-1418	886	0,71
männlich	≥18	1079	602	1144	558-634	1100-1388	884	0,69
weiblich	≥18	1068	589	1406	535-614	1090-1450	848	0,90

Die Berechnung erfolgte nur für Personen ≥18 Jahre, da in der Altersgruppe <18 Jahre nur 10 erstmalige MIA Konzentrationsbestimmungen vorlagen. Statistisch wurde auch die 2,5. Perzentile berechnet, wobei dieser nur aus informativen Gründen dargestellt wurde, denn bei Tumormarkern basiert der Referenzbereich üblicherweise nur auf der 97,5. Perzentile [46,70,71]. Der gemeinsame MIA Referenzbereich für Personen ≥18 Jahre wurde mit MIA ≤1154 pg/ml (90% KI = 1120-1418 pg/ml) berechnet. Eine weitere Partitionierung nach Geschlecht erbrachte für männliche Personen ≥18 Jahre

einen Referenzbereich (MIA ≤ 1144 pg/ml) der sich nur geringfügig vom gemeinsamen Referenzbereich unterschied. Allerdings lag der für weibliche Personen ≥ 18 Jahre partitionierte Referenzbereich (MIA ≤ 1406 pg/ml) höher. Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Serum MIA Konzentration zwischen männlichen (mittlerer Rang = 1083,78) und weiblichen (mittlerer Rang = 1064,12) Personen ≥ 18 Jahre ($p=0,463$).

In Tabelle 9 sind zusätzlich die 90 % KI der Referenzbereiche angegeben. Die Breite dieser 90 % KI betrug 26 % (gemeinsam), 25 % (männlich) und 26 % (weiblich) des jeweiligen Referenzbereichs. Ergänzend ist zu erwähnen, dass der geschätzte Anteil nicht-pathologischer Werte für den gemeinsamen (71 %) und männlichen (69 %) Datensatz niedriger lag als im weiblichen Datensatz (90 %).

4 DISKUSSION

4.1 Stabilität des MIA Proteins im Serum

Die Stabilität eines zu untersuchenden Analyten in der Probenmatrix ist wesentlich für die labordiagnostische Qualitätssicherung der präanalytischen Phase [40,72]. Der Begriff Stabilität kann in diesem Zusammenhang definiert werden als Erhaltung der physikochemischen Eigenschaften des Analyten im zeitlichen Verlauf [72]. Um die Stabilität zu bestimmen, muss zunächst die maximal zulässige Instabilität definiert werden, das heißt welche relative Messabweichung vom Ausgangswert maximal zugelassen wird [40,72]. Darauf basierend wird die Stabilitätsgrenze festgelegt, entsprechend dem Zeitpunkt unter bestimmten Lagerungsbedingungen, zu dem diese maximal zulässige Instabilität bzw. Messabweichung erreicht ist [40,72]. Da zum MIA Protein in den relevanten Richtlinien [73] keine Angabe gemacht wird, wurde als maximal zulässige Instabilität eine 10 % Abweichung von der Ausgangskonzentration zugrunde gelegt [40].

Demnach war das Serum MIA Protein in der vorliegenden Arbeit für maximal 1 Tag bei Raumtemperatur stabil. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur wich die mittlere MIA Konzentration bereits >10 % vom Ausgangswert ab, und überschritt somit die zuvor definierte maximal zulässige Instabilität. Für einen Probenversand oder eine langfristige Probenlagerung deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, im Zeitraum von 14 Tagen, auf eine ausreichende Stabilität des MIA Proteins bei Kühlschranktemperatur (4-6 °C) und -20 °C hin. Ergänzend ist zu erwähnen, dass die Ausgangskonzentrationen der Stabilitätsversuche (MD=988 pg/ml) tendenziell in der Nähe der Grenze des gemeinsamen Serum MIA Referenzbereichs (MIA ≤1154 pg/ml) (siehe Abschnitt 3.3.2) lagen. Dies ist vorteilhaft einzustufen, denn die Stabilität könnte durch die Analytkonzentration beeinflusst werden [74], weshalb Stabilitätsversuche im Konzentrationsbereich nahe der klinischen Entscheidungsgrenze stattfinden sollten [72].

Die vorliegenden Ergebnisse der Stabilitätsversuche sind mit einer Studie von Djukanovic et al. (2001) vereinbar, in der unter anderem die MIA Stabilität nach dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur oder 4 °C untersucht wurde [75]. Dabei wurden 324 Blutproben von 50 Personen mit AJCC Stadium IV Melanom verwendet, und die Messung der MIA Konzentrationen erfolgte mittels Roche MIA ELISA (Roche

Diagnostics GmbH, Deutschland) [75]. In der genannten Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der MIA Konzentration in Serum- oder Vollblutproben nach dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur oder 4 °C festgestellt werden [75]. Weitere publizierte Daten zur MIA Stabilität bei Lagerung über 3 Stunden, oder zur gefrorenen Lagerung, bestanden bisher nach bestem Wissen nicht.

Von klinischer Relevanz im Rahmen der Melanom Diagnostik dürfte jedoch auch ein Vergleich der Stabilität des MIA Proteins mit dem etablierten Tumormarker S100B sein [75]. Djukanovic et al. (2001) sahen beispielsweise in ihrer zuvor erwähnten Arbeit, dass Serum- und Vollblutproben nach dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zur sofortigen Messung statistisch signifikant höhere S100B Konzentrationen aufwiesen [75]. Zu anderen Ergebnissen kam eine Arbeit von Raabe et al. (2003), in der nach bis zu 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede der S100B Konzentration zwischen Lagerung bei Raumtemperatur und 4 °C festgestellt wurden [76]. Für den Elektrochemilumineszenz-Immunoassay Elecsys S100 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) wird jedoch herstellerseitig eine Stabilität des Serums von 8 Stunden bei 20-25 °C, 2 Tage bei 2-8 °C und 3 Monate bei -20 °C angegeben [77]. Richtet man sich unter Verwendung des Elecsys S100 Assays nach den Herstellerangaben, so wäre MIA gegenüber S100B bei Raumtemperatur tendenziell etwas länger stabil. Insbesondere bei Kühlschranktemperatur hätte MIA jedoch gegenüber der herstellerseitig angegebenen S100B Stabilität einen Vorteil, denn in der vorliegenden Arbeit konnte für MIA eine Stabilität bei 4-6 °C von mindestens 14 Tagen festgestellt werden. Bei diesem Vergleich muss allerdings einschränkend bedacht werden, dass die herstellerseitig angegebene Probenstabilität des Elecsys S100 Assays möglicherweise auf einem anderen Versuchsaufbau und abweichenden Stabilitätskriterien basiert.

Bezüglich der Stabilität nach Einfrier-Auftau Vorgängen wurde in der vorliegenden Arbeit nach dreimaliger Wiederholung eines Einfrier-Auftau Zyklus keine signifikante Beeinflussung der MIA Konzentration festgestellt, was in medizinischen Laboratorien von Vorteil ist. Vergleicht man dies mit der S100B Bestimmung, so wurde für S100B in einer vorausgehenden Arbeit nach einem Einfrier- und Auftauvorgang ebenfalls keine Beeinflussung der Konzentration gegenüber einer sofortigen Messung festgestellt [76]. Herstellerseitig wird für den Elektrochemilumineszenz-Immunoassay Elecsys S100 sogar angegeben, dass fünfmaliges Einfrieren möglich sei [77].

Hinsichtlich der Stabilität nach Einfrier-Auftau Vorgängen scheinen sich MIA und S100B offensichtlich nicht relevant voneinander zu unterscheiden.

Zusammenfassend kann hinsichtlich der Probenstabilität empfohlen werden die Serum MIA Konzentration bei Raumtemperatur innerhalb eines Tages zu messen. Ein herkömmlicher Probenversand ist jedoch nur gekühlt oder gefroren zu empfehlen.

4.2 Interferenzanfälligkeit der MIA Konzentrationsmessung

In der medizinischen Labordiagnostik können Hämolyse, Ikterie und Lipämie zu Interferenzen führen [39,56,57]. Dabei geht man bei Analyten wie dem MIA Protein, zu denen in den relevanten Richtlinien [73] keine Angaben gemacht werden, von einer klinisch relevanten Interferenz aus, wenn die Messung $\geq 10\%$ von der ungestörten Messung abweicht [40]. Diese Definition einer relevanten Interferenz wurde in der vorliegenden Arbeit – auch in Anbetracht der relativ kleinen Variationskoeffizienten des verwendeten ELISA (siehe Abschnitt 3.2) – angewandt.

Besonders häufig treten Interferenzen in hämolytischen Proben auf [38]. Dabei gibt es, neben vielfältigen in vivo Ursachen, auch eine Reihe an präanalytischen Faktoren, die eine Hämolyse begünstigen und somit die Labordiagnostik stören [78]. Besonders häufig wird im Rahmen der Präanalytik eine zu energische Blutentnahme als Ursache der Hämolyse gefunden [78]. Aber selbst die Art des Probenverkehrs zum Labor kann bereits eine messbare Hämolyse verursachen [79,80]. Ein möglicher Störungsmechanismus ist die Freisetzung intrazellulär höher konzentrierter Analyten nach extrazellulär, wodurch die gemessene Konzentration des Analyten steigt [39,40]. Des Weiteren kommen chemische Störungen der analytischen Methode durch die freigesetzten intrazellulären Bestandteile, sowie Interferenzen bei optischen Methoden durch die Farbe des Hämoglobins in Betracht [39,40]. In der vorliegenden Arbeit zeigten freie Hämoglobin Konzentrationen bis 4605 mg/l keine Abweichungen der MIA Konzentration $\geq 10\%$, was die korrekte Bestimmung der Serum MIA Konzentration auch in stark hämolytischen Proben ohne Interferenz ermöglicht.

Bei einem Ikterus kommt es im Rahmen einer Hyperbilirubinämie zu gelblichen Verfärbungen von Haut, Schleimhäuten, Skleren und Körperflüssigkeiten [81]. Dieses klinische Symptom kann vielfältige differenzialdiagnostische Ursachen haben [81], und in der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik zu analytischen Interferenzen führen [56]. Als Ursache kommen spektrale und chemische Interferenzen bei der Analytik in

Betracht [40,82]. Ein bekanntes Beispiel ist die Störung der Jaffé Methode zur Kreatinin Bestimmung [83–87]. In der vorliegenden Arbeit ergaben direkte Bilirubin Konzentrationen bis 43,9 mg/dl keine Tendenz zu gestörten Messergebnissen. Lediglich in einer Probe kam es zu etwas ausgeprägteren Schwankungen der relativen MIA Konzentration, wobei sich dieses Phänomen in den anderen drei Proben nicht bestätigte. Vermutlich handelt es sich um eine zufällige Schwankung, jedoch wäre in zukünftigen Studien eine Überprüfung mit größeren Fallzahlen erstrebenswert. Zudem sollte die Möglichkeit bedacht werden, dass physiologisches konjugiertes Bilirubin gegenüber dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten direkten Bilirubin Standard unterschiedliche Interferenzen verursachen könnte [87]. Jedoch ist die Verwendung dieses direkten Bilirubin Standards für Interferenztestungen gängig [87–89]. Neben konjugierten Bilirubin könnte außerdem auch unkonjugiertes Bilirubin Interferenzen - potentiell auch gegensätzlich zum konjugierten Bilirubin - verursachen [82,90].

Lipämische Proben entstehen präanalytisch meistens durch einen unpassenden Zeitpunkt der Blutentnahme nach einer Mahlzeit oder nach parenteraler Gabe einer synthetischen Lipid Emulsion [91]. Weitere Ursachen lipämischer Proben sind primäre und sekundäre Hypertriglyzeridämien [57,91]. Als Störungsmechanismen sind Erhöhungen der nicht-wässrigen Phase, und Trennungseffekte zwischen polarer und nicht-polarer Phase innerhalb der Probe möglich [69,92]. Relevant sind auch Interferenzen durch Trübung der Probe, was besonders photometrische Messmethoden stören kann [69,92]. In der vorliegenden Arbeit zeigten Triglyzerid Konzentrationen bis 4298 mg/dl, beziehungsweise am cobas c503 Analysemodul gemessene Lipämie-Indices bis 884, keine Abweichungen der MIA Konzentration $\geq 10\%$. Als Störgröße wurde in der vorliegenden Arbeit die Sojaöl-basierte Lipid Emulsion Lipofundin MCT 20 % verwendet. Bereits 1988 wurde in einer Arbeit von Nanji et al. (1988) gezeigt, dass bei gleicher Triglyzerid Konzentration trotzdem unterschiedliche Interferenz Effekte auftreten können, abhängig davon ob die Triglyzerid Konzentration durch eine künstliche Lipid Emulsion oder menschliches lipämisches Serum entstand [93]. Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine künstliche Lipid Emulsion zur Lipämie Interferenztestung verwendet wurde, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine erkrankungsbedingt lipämische Probe andere Interferenzen bei der Messung der MIA Konzentration verursacht [67,68,82]. Es muss jedoch bedacht werden, dass lipämische Proben in den medizinischen

Laboratorien zumindest teilweise durch parenterale künstliche Lipid Emulsionen verursacht werden, und eine Testung auf diese Interferenz deshalb trotzdem sinnvoll ist [57,94]. Für lipämische Proben ist außerdem bekannt, dass die Triglyzerid Konzentration nicht gut mit der Probentrübung korreliert [67–69]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Lipämie-Indices des cobas c503 Analysemoduls dargestellt, um den Trübungsgrad besser einschätzen zu können [67–69]. Nach Zugabe einer Lipid Emulsion wurde in der Literatur eine gute Korrelation zwischen Triglyzerid Konzentration und Probentrübung beschrieben [67–69], was mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit vereinbar ist.

Bisher bestanden nach besten Wissen keine publizierten Daten zu Störungen des R&D oder Roche MIA ELISA durch hämolytische, ikterische oder lipämische Proben. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse der Interferenztestung sind plausibel, denn bei Immunoassays sind tendenziell wenig Interferenzen durch Hämolyse und Hyperbilirubinämie zu erwarten, und Störungen durch lipämische Proben treten besonders bei der Bestimmung lipophiler Substanzen auf [95]. Generell sind bei Immunoassays Interferenzen besonders häufig durch heterophile Antikörper verursacht [95–98]. Hierzu zählen auch humane Anti-Maus-Antikörper, die besonders bei sogenannten Sandwich Immunoassays, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, zu Interferenzen führen können [95–98]. Diese Antikörper können beispielsweise nach therapeutischem oder diagnostischem Einsatz von monoklonalen Maus-Antikörpern entstehen [96,99–101]. Angaben zu Prävalenzen schwanken teilweise stark, denn diese Antikörper – insbesondere diejenigen mit anti-idiotypischer Spezifität – sind schwierig zu bestimmen, weil es für sie keinen universell anwendbaren Assay gibt [96]. Derartige Interferenzen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollten daher in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Außerdem ist zu erwähnen, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben MIA Konzentrationen aufwiesen, die tendenziell - auf Basis der indirekt berechneten MIA Referenzbereiche - als normwertig oder nur leicht erhöht einzustufen sind. Somit kann nicht auf die Interferenzanfälligkeit bei stark erhöhten MIA Konzentrationen geschlossen werden, denn für manche Assays wurde in der Literatur beschrieben, dass Interferenzen durch Hämolyse abhängig von der Analytkonzentration waren [82,102,103].

Labordiagnostisch relevant ist auch ein Vergleich zwischen der Interferenzanfälligkeit der MIA Bestimmung gegenüber der Bestimmung des etablierten Melanom Tumormarkers S100B. Für die S100B Bestimmung kommen verschiedene Assays

zum Einsatz [104]. Beispielsweise wurden für den Elektrochemilumineszenz-Immunoassay Elecsys S100 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) herstellerseitig bis zu den Konzentrationen Bilirubin ≤ 66 mg/dl, Hämoglobin ≤ 1000 mg/dl und Intralipid ≤ 2000 mg/dl keine Interferenzen gefunden [77]. Da sich diese Konzentrationen jedoch üblicherweise auf die semiquantitativen Bestimmungen der Roche Hämolyse-, Ikterie- und Lipämie-Indices beziehen, können diese Werte nicht uneingeschränkt mit den quantitativen Messungen in der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Diese Herstellerangaben legen jedoch nahe, dass die S100B Bestimmung mittels Elecsys S100 Assay bis zu relativ hohen Konzentrationen der Hämolyse-, Ikterie- und Lipämie-Störfaktoren ohne Interferenzen stattfinden kann. Im Vergleich dazu zeigte auch der R&D MIA ELISA in der vorliegenden Arbeit bis zu relativ hohen Konzentrationen der Störgrößen keine Interferenzen, was in medizinischen Laboratorien sehr vorteilhaft einzustufen ist.

Zusammenfassend ließ sich in der vorliegenden Arbeit nach Zugabe eines Hämolysats (freies Hämoglobin bis 4605 mg/l), direkten Bilirubin Standards (direktes Bilirubin bis 43,9 mg/dl) und einer künstlichen Lipidemulsion (Triglyzeride bis 4298 mg/dl, Lipämie-Index bis 884) keine Tendenz zu Störungen der Serum MIA Konzentrationsbestimmung mittels R&D MIA ELISA feststellen.

4.3 Einfluss des Testverfahrens auf die Messung der MIA Konzentration

In der vorliegenden Arbeit wurden die analytischen Kenngrößen der Präzision und Richtigkeit anhand von Kontrollmaterialien und gepoolten Serum Proben bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die drei verwendeten Kontrollen herstellerseitig auf niedrigen MIA Konzentrationsniveaus lagen. Dementsprechend wurden zusätzlich gepoolte Serum Proben auf drei MIA Konzentrationsniveaus hergestellt, die eher den in der Routinediagnostik erwarteten Konzentrationen (siehe Abschnitt 3.3.2) entsprechen. Es ergaben sich Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten von $\leq 4,8$ % und $\leq 6,5$ %. Insgesamt deuten die Variationskoeffizienten auf eine gute analytische Präzision des R&D MIA ELISA hin. Die Ergebnisse sind zudem mit den Angaben des Herstellers vereinbar, der Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten von $\leq 3,5$ % und $\leq 6,0$ % beschrieb [58].

Die relative Unrichtigkeit des verwendeten ELISA lag für die drei Kontrollmaterialien unter Verwendung von drei unterschiedlichen ELISA Kit Chargen durchwegs im

positiven Zahlenbereich, was im Untersuchungszeitraum auf eine Tendenz zu systematisch leicht erhöhten Messungen gegenüber den Zielkonzentrationen der Kontrollen hindeuten könnte. Diese Tendenz erscheint jedoch mit einer maximalen relativen Unrichtigkeit von 10,2 % (Intra-Assay) und 9,0 % (Inter-Assay) eher gering. Auffallend war außerdem, dass die relative Unrichtigkeit bei der niedrigen Kontrolle am stärksten ausgeprägt war, und mit steigender MIA Konzentration der Kontrollen schrittweise abnahm. Insbesondere die niedrige Kontrolle befand sich jedoch mit einem herstellereitigen Zielbereich von 125-204 pg/ml auf einem Konzentrationsniveau, welches in der klinischen Routinediagnostik kaum anzutreffen ist (siehe Abschnitt 3.3.2), weshalb die klinische Relevanz einer etwas ausgeprägteren Unrichtigkeit bei dieser Kontrolle fraglich ist. Einschränkend ist außerdem zu bedenken, dass die berechnete Richtigkeit des Tests auf den Kontrollmaterialien des Herstellers und deren Zielwerten basiert. Diese Zielwerte sind jedoch methodenabhängig, denn sie wurden mit derselben ELISA Methode generiert, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war. Optimaler wäre die Beurteilung der Richtigkeit anhand eines Referenzmaterials, dessen Konzentration mittels eines Referenzmessverfahrens bestimmt wurde [73]. Jedoch gibt es bisher für das MIA Protein kein einheitliches Referenzmaterial oder ein definiertes Referenzmessverfahren.

Zusammenfassend erscheinen die analytischen Kenngrößen der Präzision und Richtigkeit des R&D MIA ELISA für die klinische Diagnostik geeignet.

Zur Bestimmung der Serum MIA Konzentration sind derzeit die ELISA von R&D (R&D Systems Inc., USA) [105] und Roche (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) [9,16,106] kommerziell erhältlich, wobei es bislang an wissenschaftlichen Publikationen zur Vergleichbarkeit der beiden Tests mangelte. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant positive Korrelation ($r=0,938$) der beiden Tests festgestellt werden. Betrachtet man Methodenvergleiche bei Immunoassays verschiedener anderer Tumormarker, so kann eine solche Korrelation als gute Korrelation eingestuft werden [107–109]. Gleichzeitig zeigte die Passing-Bablok-Regression der vorliegenden Arbeit, dass die beiden Tests aufgrund signifikant konstanter und proportionaler Unterschiede nicht uneingeschränkt gegeneinander austauschbar sind [110,111]. Im Bland-Altman-Diagramm der vorliegenden Arbeit lagen die Roche MIA Konzentrationen im Mittel sogar 87 % über den R&D MIA

Konzentrationen. Der verwendete Test sollte somit bei der MIA Befundinterpretation dringend beachtet werden und den EinsenderInnen der Proben mitgeteilt werden.

Es ist ein bekanntes Problem, dass unterschiedliche Immunoassays für denselben Tumormarker teilweise zu deutlich unterschiedlichen Messergebnissen führen können [70,112,113]. Als mögliche Ursache kommt die Verwendung unterschiedlicher Antikörper in Betracht, wodurch abweichende Strukturen des Tumormarker Moleküls erkannt werden [112,114]. Beispielsweise wurde in einer Arbeit von Molina et al. (2008) der Tumormarker CA15-3 vergleichend mit zwei Immunoassays bestimmt die unterschiedliche Antikörper verwendeten [109]. In der genannten Arbeit wurde abhängig von der Messmethode ein Unterschied der CA15-3 Konzentration von 20-40 % beschrieben [109].

In der vorliegenden Arbeit wären unterschiedliche MIA spezifische Antikörper auch eine mögliche Ursache der diskrepanten Wertelage der beiden MIA Assays. Der R&D MIA ELISA verwendet methodisch ein Zwei-Schritt ELISA Verfahren, wobei der Fängerantikörper direkt auf die Festphase beschichtet ist [58]. Herstellerseitig wird für den Fängerantikörper lediglich angegeben, dass es sich um einen monoklonalen Antikörper spezifisch für humanes MIA handelt [58]. Der im zweiten Schritt zugesetzte Enzym-markierte Signalantikörper ist ebenfalls spezifisch für humanes MIA, jedoch polyklonaler Beschaffenheit [58]. Demgegenüber ist der Roche MIA ELISA ein Ein-Schritt ELISA mit Streptavidin-Biotin Trenntechnik [9,115]. Als Biotin-markierte Fängerantikörper und Peroxidase-markierte Signalantikörper werden zwei unterschiedliche monoklonale Maus-Antikörper eingesetzt, wobei der Signalantikörper ein Fab-Fragment ist [9,115]. Der Fängerantikörper (MAB 2F7) des Roche MIA ELISA ist gegen C-terminale Peptide gerichtet, wohingegen der Signalantikörper (MAB 1A12) sich gegen N-terminale Peptide richtet [9,115]. Möglicherweise binden die Antikörper des R&D MIA ELISA an hiervon abweichende Regionen, wodurch eine andere Wertelage gemessen wird.

Von klinischer und labordiagnostischer Relevanz könnte auch die Entdeckung eines alternativen MIA Spleiß Produkts durch Hau et al. (2002) sein [116]. In dieser Arbeit wurde berichtet, dass diesem MIA Spleiß Produkt Exon 2 des ursprünglichen MIA Proteins fehlte, und sich der C-terminale Bereich des MIA Proteins veränderte [116]. Dieses alternative MIA Spleiß Produkt konnte mit einem N-terminal gerichteten MIA Antikörper detektiert werden, mit einem C-terminal gerichteten MIA Antikörper jedoch nicht [116]. Ob, und wie stark, derartige MIA Spleiß Produkte von den Antikörpern des

R&D und Roche MIA ELISA miterfasst werden und diese gegebenenfalls beeinflussen ist bisher nicht genau bekannt. Weitere Studien hierzu dürften jedoch interessante diagnostische und therapeutische Informationen liefern [116].

Letztlich könnte die abweichende Wertelage der beiden MIA Assays auch durch Kalibration mit unterschiedlichen MIA Standards bedingt sein [114]. Für den Roche MIA ELISA wurde beschrieben, dass die Kalibration gegen Standard Konzentrationen von purifiziertem rekombinantem MIA aus stabil transfizierten CHO(Chinese Hamster Ovary)-Zellen erfolgte [9]. Demgegenüber erfolgt beim R&D MIA ELISA eine Kalibration mit Standards, die Escherichia coli exprimiertes rekombinantes MIA enthalten [58]. Weitere Unterschiede können in den purifizierten Standardmaterialien auch durch Protein Abbau und Modifikation während des Herstellungsprozesses entstehen [114]. Hinzu kommt, dass beide MIA Assays rekombinantes MIA für die Kalibration nutzen [9,58,115], welches sich möglicherweise von der MIA Protein Zusammensetzung in der Matrix des menschlichen Bluts unterscheidet [114]. Wie bereits für andere Tumormarker diskutiert oder bereits umgesetzt, ist auch für die klinische Verwendung von MIA eine Standardisierung der Kalibration erstrebenswert, wofür allerdings die Etablierung von geeigneten Referenzmaterialien eine Voraussetzung wäre [112,117].

4.4 Referenzbereiche der Serum MIA Konzentration

In der vorliegenden Arbeit konnte indirekt über statistische Verfahren anhand eines großen Datensatzes ein laborinterner gemeinsamer Serum MIA Referenzbereich für Personen ≥ 18 Jahre bestimmt werden ($MIA \leq 1154$ pg/ml). Der Referenzbereich bezieht sich nur auf MIA Messungen mit dem R&D MIA ELISA, der deutlich niedrigere MIA Konzentrationen bestimmte als der Roche MIA ELISA. Zusätzlich wurden indirekte laborinterne MIA Referenzbereiche getrennt für männliche ($MIA \leq 1144$ pg/ml) und weibliche ($MIA \leq 1406$ pg/ml) Personen ≥ 18 Jahre bestimmt. Dabei lag der weibliche Referenzbereich etwas höher, wenngleich er noch knapp im 90 % KI des gemeinsamen Referenzbereichs lag. Dieses Phänomen wäre möglicherweise vereinbar mit Erkenntnissen von Hofmann et al. (2009), die bei älteren Frauen häufiger falsch positive MIA Werte fanden [27]. Allerdings zeigten sich in der vorliegenden Arbeit im Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede der Serum MIA Konzentration in Abhängigkeit vom Geschlecht. Dies ist wiederum

vereinbar mit einer anderen Studie, die ebenfalls keine Unterschiede der MIA Konzentration männlicher und weiblicher Personen fand [105]. Auffallend war in der vorliegenden Arbeit außerdem, dass alle Serum MIA Referenzbereiche relativ breite 90 % KI aufwiesen, was auf zu kleine Fallzahlen hinweisen könnte [44,49]. Somit sollte der gemeinsame Referenzbereich aufgrund der größeren Fallzahl bevorzugt werden, zumal sich die 90 % KI der partitionierten Referenzbereiche mit dem gemeinsamen Referenzbereich überschneiden [49]. In Zukunft wäre eine erneute indirekte Berechnung der Referenzbereiche mit dem RLE Programm interessant, denn mit weiter steigender Fallzahl im laborintern zur Verfügung stehenden Datensatz könnte es eventuell auch zu einer Verkleinerung der 90 % KI der Referenzbereiche kommen [49].

Eine Altersabhängigkeit von bestimmten labordiagnostischen Untersuchungen ist ein viel untersuchtes und bekanntes Phänomen [36]. Allerdings hält sich die Anzahl der Studien zur Altersabhängigkeit der Serum MIA Konzentration in Grenzen. In einer Studie von Bosserhoff et al. (1997) wurden in einer gesunden Population im Alter zwischen 19-86 Jahren keine Unterschiede der MIA Konzentration in Abhängigkeit von der Altersgruppe (≤ 30 Jahre, 31-60 Jahre, > 60 Jahre) gefunden [9]. Bei Kindern und Jugendlichen unter 17 Jahren wurden allerdings in einer Studie von Bosserhoff et al. (2004) erhöhte Serum MIA Konzentrationen festgestellt, wobei dies bei den unter Dreijährigen besonders ausgeprägt war [118]. Die Autoren und Autorinnen der Studie vermuteten, dass dies auf die Aktivität und Proliferation der Chondrozyten während des Wachstums zurückzuführen ist [118]. Somit wären für pädiatrische PatientInnen differenziertere Referenzbereiche notwendig [118].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich für erwachsene Personen in der graphischen Darstellung der altersabhängigen medianen MIA Konzentration keine Altersabhängigkeit erkennen. Eine statistische Auswertung nach Altersgruppen zeigte jedoch signifikante Unterschiede der zentralen Tendenzen der MIA Konzentration zwischen den Altersgruppen 18-30 Jahre (MD=1061 pg/ml) und 31-60 Jahre (MD=898 pg/ml), sowie zwischen 31-60 Jahre (MD=898 pg/ml) und > 60 Jahre (MD=957 pg/ml). Diese Ergebnisse decken sich nicht mit der bereits erwähnten Studie von Bosserhoff et al. (1997) [9], obwohl in dieser Studie vergleichbare Altersgruppen wie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. In Anbetracht der sich zwischen den Altersgruppen nur geringfügig unterscheidenden medianen MIA Konzentrationen ist der signifikante Unterschied in der vorliegenden Arbeit jedoch von fraglicher

diagnostischer Relevanz. Zudem sind die berechneten Effektstärken nach Cohen (1988) als schwach einzustufen [119]. Es ist denkbar, dass in der Altersgruppe 18-30 Jahre bereits eine stärkere Vorselektion der PatientInnen stattfand, sodass in dieser Altersgruppe - bei gleichzeitig kleineren Fallzahlen (n=62) - vermehrt pathologische MIA Messungen vorlagen. Bezüglich des in der vorliegenden Arbeit festgestellten signifikanten Unterschieds zwischen den Altersgruppen 31-60 Jahre und >60 Jahre könnte ursächlich möglicherweise eine im Alter abnehmende Nierenfunktion sein [24,120,121]. So diskutierten Auge et al. (2005), dass ihre Arbeitsgruppe bei Personen mit Nierenversagen häufig erhöhte MIA Konzentrationen feststellte [24]. Die Daten hierzu wurden jedoch von der Arbeitsgruppe nicht publiziert [24]. Dazu passend fand eine große Proteomik Studie eine Assoziation zwischen dem MIA Protein und der eGFR [121]. In dieser Studie wurde zudem ein kausaler negativer Effekt des MIA Proteins auf die eGFR festgestellt [121]. Es wäre somit denkbar, dass auch eine nicht als Nierenversagen einzustufende Abnahme der Nierenfunktion mit etwas erhöhten MIA Konzentrationen verbunden ist, und sich hierdurch die signifikant höheren Konzentrationen bei den PatientInnen >60 Jahre erklären lassen. Für zukünftige Studien wäre daher eine diagnostisch relevante Frage, ob in einem tumorfreien Referenzkollektiv eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Serum MIA Konzentrationen und einer abnehmenden Nierenfunktion besteht.

4.4.1 Einordnung der neu berechneten indirekten Serum MIA Referenzbereiche

Nach bestem Wissen besteht derzeit nur eine publizierte Studie, die eine MIA Konzentrationsbestimmung mittels R&D MIA ELISA durchführte, und sich somit zum Vergleich der neu berechneten MIA Referenzbereiche anbietet [105]. In dieser Studie von Li et al. (2021) wurde bei 22 tumorfreien Personen die mittlere MIA Konzentration (615,6 pg/ml) bestimmt, wobei als Probenmaterial Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Plasma verwendet wurde [105]. Somit lagen die von Li et al. (2021) [105] beschriebenen mittleren MIA Konzentrationen deutlich niedriger als die mittleren MIA Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit. Die Alters- und Geschlechterverteilung der von Li et al. (2021) [105] untersuchten Personen unterschied sich nicht wesentlich von den Verteilungen in der vorliegenden Arbeit. Auch die Verwendung von EDTA Plasma statt Serum [105] sollte, unter Betrachtung der Herstellerangaben des Assays [58],

keine niedrigere MIA Wertelage erzeugen. In der Studie wird als potentieller Einflussfaktor die Ethnizität der untersuchten Personen diskutiert [105].

Ein weiterer Vergleich kann zu einem direkt bestimmten laborinternen Serum MIA Referenzbereich des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Regensburg gezogen werden. Dieser Referenzbereich wurde anhand von 36 erwachsenen PatientInnen unterschiedlicher Altersstufen unter Verwendung des R&D MIA ELISA bestimmt. Dabei wurden klinikinterne Serumproben verschiedener stationärer und ambulanter PatientInnen verwendet, wobei (hämato-)onkologische Stationen und Ambulanzen ausgeschlossen wurden. Obwohl in diesem Fall der Referenzbereich auf der 95. Perzentile basiert, liegt dieser direkt bestimmte gemeinsame MIA Referenzbereich ($MIA \leq 1628 \text{ pg/ml}$) höher als der indirekt bestimmte gemeinsame Referenzbereich der vorliegenden Arbeit ($MIA \leq 1154 \text{ pg/ml}$). Eine mögliche Ursache könnte das jeweils zugrundeliegende Referenzkollektiv sein [42,122]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Datensatz enthielt beispielsweise eine Vielzahl an Einsendungen aus der ambulanten Krankenversorgung. Wohingegen das Kollektiv des laborintern direkt bestimmten Referenzbereichs zwar auch ambulante PatientInnen enthielt, vermutlich jedoch in einem geringeren Verhältnis. Ein höherer Anteil ambulanter PatientInnen könnte möglicherweise aufgrund geringerer Komorbidität [24,31,34,41,106] zu niedrigeren MIA Konzentrationen im untersuchten Kollektiv führen. Des Weiteren war die Größe des Kollektivs der direkten Referenzbereich Bestimmung mit nur 36 Personen sehr klein, wodurch die Aussagekraft eingeschränkt wird [44,123].

Zur besseren Einordnung des gemeinsamen R&D MIA Referenzbereichs ($R\&D \text{ MIA} \leq 1154 \text{ pg/ml}$) der vorliegenden Arbeit, sollte orientierend der korrespondierende Referenzbereich für die Roche MIA ELISA Wertelage geschätzt werden. Hierfür wurde der R&D MIA Grenzwert in die Passing-Bablok-Regressionsformel $R\&D \text{ MIA [pg/ml]} = 262 \text{ pg/ml} + 0,09 \cdot (\text{Roche MIA [pg/ml]})$ (siehe Abschnitt 3.2) eingesetzt. Es ergab sich ein geschätzter Grenzwert von $\leq 9911 \text{ pg/ml}$ für die Roche MIA ELISA Wertelage. Vergleicht man diesen geschätzten Roche MIA Referenzbereich mit bisherigen Literaturangaben, so finden sich sowohl Studien mit höheren [23,27] als auch mit niedrigeren Grenzwerten der MIA Konzentration [9,18,124]. Eine frühe Studie von Bosserhoff et al. (1997) berechnete beispielsweise anhand einer Gruppe von 72 gesunden Personen die 95. Perzentile ($MIA = 6,5 \text{ ng/ml}$ bzw. 6500 pg/ml) [9]. Eine nachfolgende Studie berechnete unter Verwendung des

Boehringer Mannheim - heute Roche Diagnostics GmbH - ELISA die 95. Perzentile (MIA = 7,9 ng/ml bzw. 7900 pg/ml) gesunder, männlicher und weiblicher erwachsener Personen [124]. Juergensen et al. (2001) definierten in ihrer Arbeit Werte >4,5 ng/ml (bzw. >4500 pg/ml) (>97. Perzentile) als positiv, basierend auf 212 gesunden Personen im Alter 19-86 Jahre [18]. Einen höheren Grenzwert berechneten Garbe et al. (2003) anhand von 120 PatientInnen ohne Melanom oder anderen malignen Erkrankungen (95. Perzentile MIA = 10,49 ng/ml bzw. 10490 pg/ml) [23]. Auch Hofmann et al. (2009) bestimmten in einem dermatologischen Referenzkollektiv ohne Melanom oder anderen malignen Erkrankungen tendenziell eine höher liegende 97,5. Perzentile (MIA = 11,83 ng/ml bzw. 11830 pg/ml) [27].

Zusammenfassend liegt der in der vorliegenden Arbeit neu berechnete gemeinsame MIA Referenzbereich etwas niedriger als ein zuvor am Universitätsklinikum Regensburg erstellter direkter Referenzbereich. Nach Schätzung der entsprechenden Roche MIA ELISA Wertelage fügt sich der neu berechnete Referenzbereich jedoch plausibel in die bisherige Literatur ein.

4.4.2 Vor- und Nachteile der indirekten Referenzbereich Bestimmung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur indirekten Bestimmung der MIA Referenzbereiche hat sowohl Vorteile als auch gewisse Limitationen. Eine wichtige Limitation ist das Vorhandensein von erkrankten Personen in dem ausgewerteten Datensatz, wie bereits in anderen Arbeiten erwähnt [41,48,50,125]. Zwar sind keine klinischen Informationen bekannt, allerdings muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den im Datensatz enthaltenen erstmaligen MIA Konzentrationsbestimmungen sowohl um Vorsorge Untersuchungen bei krankheitsfreien Individuen als auch um Verlaufskontrollen oder Erstdiagnosen von Melanom PatientInnen handelt. Das verwendete RLE Programm basiert jedoch auf der Annahme, dass in einem sehr großen Datensatz der Anteil pathologischer Werte an der Gesamtheit gering ist [52,64]. Ob diese Annahme zutrifft kann nicht abschließend beurteilt werden, denn es lagen keine klinischen Informationen zu den untersuchten Individuen vor. Gegen einen außergewöhnlich hohen Anteil erkrankter Individuen im Gesamtdatensatz spricht allerdings, dass alle berechneten Referenzbereiche tendenziell niedriger lagen als ein zuvor laborintern direkt bestimmter gemeinsamer MIA Referenzbereich.

Eine potentielle Limitation besteht auch darin, dass keine genaueren Informationen zu präanalytischen Faktoren vorlagen [126]. So besteht der verwendete Datensatz aus Messungen sowohl ungefrorener oder aufgetauter Seren als auch gefrorener und gekühlter Seren. Dies könnte jedoch gegenüber direkt bestimmten Referenzbereichen auch als Vorteil gesehen werden, da realitätsnahe präanalytische Bedingungen miterfasst werden [126]. Als weiterer Vorteil ist hervorzuheben, dass bei der verwendeten indirekten Methode gegenüber einer direkten Bestimmungsmethode die Notwendigkeit einer vorherigen Einwilligungserklärung der untersuchten Person entfällt, wodurch Verzerrungen vermieden werden könnten [126]. Außerdem handelte es sich in der vorliegenden Arbeit um ein großes Personenkollektiv. Dadurch könnte einer Stichprobenverzerrung vorgebeugt werden, wie sie bei direkten Bestimmungsmethoden aufgrund relativ kleiner Referenzkollektive auftreten kann [41].

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein Melanoma Inhibitory Activity (MIA) steht als Serum Tumormarker des malignen Melanoms in der Diskussion. Es fehlten jedoch bislang fundierte Daten zu den relevanten präanalytischen Kenngrößen der Probenstabilität und Interferenzanfälligkeit. Um diese Wissenslücke zu füllen wurde die Stabilität des MIA Proteins untersucht, indem Serumproben (n=24) bis zu 14 Tage unter verschiedenen Temperaturbedingungen gelagert wurden. Dabei zeigte das MIA Protein bei Kühlschranktemperatur oder -20 °C eine Stabilität von mindestens 14 Tagen. Hingegen war das MIA Protein bei Raumtemperatur nur 1 Tag ausreichend stabil, was zum Beispiel beim postalischen Versand einer Probe bedacht werden muss. Die Interferenzanfälligkeit des Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay (R&D Systems Inc., USA) wurde untersucht, indem Serumproben (n=4) mit Hämolyt, direkten Bilirubin Standard und künstlicher Lipidemulsion versetzt wurden. Erfreulicherweise konnten keine Interferenzen durch diese häufig vorkommenden Störgrößen festgestellt werden.

Um die analytische Leistung des Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay zu beurteilen wurden Präzision und Richtigkeit des Assays bestimmt. Bei Variationskoeffizienten $\leq 6,5\%$ und relativer Unrichtigkeit $\leq 10,2\%$ zeigte sich der MIA ELISA geeignet für die klinische Diagnostik.

Um den Einfluss des verwendeten MIA Assays auf die gemessene Konzentration zu beurteilen, erfolgte zusätzlich ein Vergleich des Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay mit einem zweiten kommerziell erhältlichen human MIA ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland). Interessanterweise bestimmte der MIA ELISA von Roche Diagnostics im Mittel 87 % höhere MIA Konzentrationen als der MIA ELISA von R&D Systems. Die beiden Assays korrelierten jedoch signifikant positiv ($r=0,938$). Die Regression nach Passing-Bablok ergab:

$$\text{R\&D MIA [pg/ml]} = 262 \text{ pg/ml} + 0,09 \cdot (\text{Roche MIA [pg/ml]})$$

Abschließend wurden über ein indirektes statistisches Verfahren anhand eines großen laborinternen MIA Messdatensatzes (N=2147) Referenzbereiche ($\leq 97,5$. Perzentile) der Serum MIA Konzentration berechnet. Der MIA Referenzbereich für alle Personen ≥ 18 Jahre lag bei ≤ 1154 pg/ml (90% KI = 1120-1418 pg/ml). Für männliche und weibliche Personen ≥ 18 Jahre lagen die MIA Referenzbereiche bei ≤ 1144 pg/ml

(1100-1388 pg/ml) und ≤ 1406 pg/ml (1090-1450 pg/ml). Allerdings unterschieden sich die MIA Konzentrationen männlicher und weiblicher Personen ≥ 18 Jahre nicht signifikant.

Zusammenfassend konnten labordiagnostisch relevante präanalytische und analytische Faktoren der Serum MIA Konzentrationsbestimmung geklärt werden. Ein Vergleich des MIA ELISA von R&D Systems mit einem zweiten kommerziell verfügbaren MIA ELISA von Roche Diagnostics zeigte eine unterschiedliche Wertelage bei guter Korrelation. Über ein statistisches Verfahren wurden plausible MIA Referenzbereiche für den MIA ELISA von R&D Systems berechnet, die das Wissen zur klinischen Interpretation der Serum MIA Konzentration erweitern.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
KI	Konfidenzintervall
MD	Median
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
MW	Mittelwert
RLE	Reference Limit Estimator

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J, Martin R. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1989 Oct 1;49(19):5358–63.
2. Apfel R, Lottspeich F, Hoppe J, Behl C, Dürr G, Bogdahn U. Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma Res.* 1992 Dec;2(5–6):327–36.
3. Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A, Jachimczak P, Lottspeich F, Buettner R, Bogdahn U. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5695–701.
4. Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R, Holak TA. Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest.* 2003 Nov;83(11):1583–94.
5. Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R, Jauch KW. Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Nov;83(9):1216–22.
6. Poser I, Tatzel J, Kuphal S, Bosserhoff AK. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene.* 2004 Aug 12;23(36):6115–24.
7. Bauer R, Humphries M, Fässler R, Winklmeier A, Craig SE, Bosserhoff AK. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem.* 2006 Apr 28;281(17):11669–77.
8. Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res.* 2001 Aug;11(4):417–21.
9. Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3149–53.
10. Vucetić B, Rogan SA, Hrabac P, Hudorović N, Cupić H, Lukinac L, Ledinsky M, Matejčić A, Lovricević I, Zekan M. Biological value of melanoma inhibitory activity serum concentration in patients with primary skin melanoma. *Melanoma Res.* 2008 Jun;18(3):201–7.
11. Hofmann MA, Schicke B, Fritsch A, Biesold S, Gussmann F, Küchler I, Voit C, Trefzer U. Impact of lymph node metastases on serum level of melanoma inhibitory activity in stage III melanoma patients. *J Dermatol.* 2011 Sep;38(9):880–6.

12. Cao MG, Auge JM, Molina R, Martí R, Carrera C, Castel T, Vilella R, Conill C, Sánchez M, Malveyh J, Puig S. Melanoma inhibiting activity protein (MIA), beta-2 microglobulin and lactate dehydrogenase (LDH) in metastatic melanoma. *Anticancer Res.* 2007 Feb;27(1B):595–9.
13. Schaller UC, Mueller AJ, Bosserhoff AK, Haraida S, Löhrs U, Buettner R, Kampik A. Melanoma inhibitory activity (MIA). Evaluation of a new tumor-associated antigen as a serum marker for uveal melanomas. *Ophthalmologe.* 2000 Jun;97(6):429–32.
14. Reiniger IW, Schaller UC, Haritoglou C, Hein R, Bosserhoff AK, Kampik A, Mueller AJ. “Melanoma inhibitory activity” (MIA): a promising serological tumour marker in metastatic uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005 Nov;243(11):1161–6.
15. Barak V, Frenkel S, Kalickman I, Maniotis AJ, Folberg R, Pe’er J. Serum markers to detect metastatic uveal melanoma. *Anticancer Res.* 2007 Aug;27(4A):1897–900.
16. Klingenstein A, Haritoglou I, Schaumberger MM, Nentwich MM, Hein R, Schaller UC. Receiver operating characteristic analysis: calculation for the marker “melanoma inhibitory activity” in metastatic uveal melanoma patients. *Melanoma Res.* 2011 Aug;21(4):352–6.
17. Meral R, Duranyildiz D, Tas F, Camlica H, Yasasever V, Kurul S, Dalay N. Prognostic significance of melanoma inhibiting activity levels in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2001 Dec;11(6):627–32.
18. Juergensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff A. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumour Biol.* 2001 Feb;22(1):54–8.
19. Bosserhoff AK, Hauschild A, Hein R, Schadendorf D, Stockfleth E, Bogenrieder T, Landthaler M, Buettner R, Stolz W. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: results of a German multicenter study. *J Invest Dermatol.* 2000 Feb;114(2):395–6.
20. Bosserhoff AK, Dreau D, Hein R, Landthaler M, Holder WD, Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001;158:158–68.
21. Deichmann M, Benner A, Kuner N, Wacker J, Waldmann V, Näher H. Are responses to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100beta or melanoma inhibitory activity (MIA)? *Melanoma Res.* 2001 Jun;11(3):291–6.
22. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3, AWMF Registernummer: 032/024OL [Internet]. 2020 [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/>

23. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, Schittek B. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer*. 2003 Apr 1;97(7):1737–45.
24. Auge JM, Molina R, Filella X, Bosch E, Gonzalez Cao M, Puig S, Malvehy J, Castel T, Ballesta AM. S-100beta and MIA in advanced melanoma in relation to prognostic factors. *Anticancer Res*. 2005 Jun;25(3A):1779–82.
25. Tas F, Yasasever V, Duranyildiz D, Camlica H, Ustuner Z, Aydiner A, Topuz E. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. *Am J Clin Oncol*. 2004 Jun;27(3):225–8.
26. Krähn G, Kaskel P, Sander S, Waizenhöfer PJ, Wortmann S, Leiter U, Peter RU. S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. *Anticancer Res*. 2001;21(2B):1311–6.
27. Hofmann MA, Gussmann F, Fritsche A, Biesold S, Schicke B, Küchler I, Voit C, Trefzer U. Diagnostic value of melanoma inhibitory activity serum marker in the follow-up of patients with stage I or II cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2009 Feb;19(1):17–23.
28. Díaz-Lagares A, Alegre E, Arroyo A, González-Cao M, Zudaire ME, Viteri S, Martín-Algarra S, González A. Evaluation of multiple serum markers in advanced melanoma. *Tumour Biol*. 2011 Dec;32(6):1155–61.
29. Bosserhoff AK, Golob M, Buettner R, Landthaler M, Hein R. MIA (“melanoma inhibitory activity”). *Biologische Funktionen und klinische Relevanz beim malignen Melanom*. *Hautarzt*. 1998 Oct;49(10):762–9.
30. Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Brüggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA, Bosserhoff AK. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J*. 2001 Feb 1;20(3):340–9.
31. Wagner V, Rudi J, Näher H, Stremmel W. Seropositivity for MIA and S100 in patients with gastrointestinal carcinomas. *Med Oncol*. 2000 Feb;17(1):35–8.
32. Dietz UH, Sandell LJ. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem*. 1996 Feb 9;271(6):3311–6.
33. Bosserhoff AK, Kondo S, Moser M, Dietz UH, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Buettner R, Sandell LJ. Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn*. 1997 Apr;208(4):516–25.
34. Müller-Ladner U, Bosserhoff AK, Dreher K, Hein R, Neidhart M, Gay S, Schölmerich J, Buettner R, Lang B. MIA (melanoma inhibitory activity): a potential serum marker for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 Feb;38(2):148–54.

35. Neidhart M, Müller-Ladner U, Frey W, Bosserhoff AK, Colombani PC, Frey-Rindova P, Hummel KM, Gay RE, Häuselmann HJ, Gay S. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000 May;8(3):222–9.
36. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol*. 2000 Mar;113(3):429–52.
37. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem*. 1997 Aug 1;43(8):1348–51.
38. Romero A, Cobos A, López-León A, Ortega G, Muñoz M. Preanalytical mistakes in samples from primary care patients. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(12):1549–52.
39. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(3):311–6.
40. Guder WG, Ehret W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Müller-Plathe O, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zwata B. Die Qualität diagnostischer Proben/The Quality of Diagnostic Samples. *Laboratoriumsmedizin*. 2002;26(5–6):267–83.
41. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, Barth JH, Ozarda Y, IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Dec 19;57(1):20–9.
42. Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):702–9.
43. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):710–4.
44. Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clin Chim Acta*. 1987 Dec;170(2–3):S13–32.
45. Solberg HE. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987 May;165(1):111–8.
46. Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):1033–42.
47. Petersen PH, Jensen EA, Brandslund I. Analytical performance, reference values and decision limits. A need to differentiate between reference intervals and decision limits and to define analytical quality specifications. *Clin Chem Lab Med*. 2011 Dec 23;50(5):819–31.

48. Arzideh F, Wosniok W, Haeckel R. Reference limits of plasma and serum creatinine concentrations from intra-laboratory data bases of several German and Italian medical centres: Comparison between direct and indirect procedures. *Clin Chim Acta*. 2010 Feb;411(3–4):215–21.
49. Arzideh F, Wosniok W, Gurr E, Hinsch W, Schumann G, Weinstock N, Haeckel R. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):1043–57.
50. Arzideh F, Brandhorst G, Gurr E, Hinsch W, Hoff T, Roggenbuck L, Rothe G, Schumann G, Wolters B, Wosniok W, Haeckel R. An improved indirect approach for determining reference limits from intra-laboratory data bases exemplified by concentrations of electrolytes / Ein verbesserter indirekter Ansatz zur Bestimmung von Referenzgrenzen mittels intra-laboratorieller Datensätze am Beispiel von Elektrolyt-Konzentrationen. *Laboratoriumsmedizin*. 2009;33(2):52–66.
51. Arzideh F, Wolters B, Klauke R. Reference Limit Estimator. Version RLE49 20180517 [software]. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.; [date unknown] [cited 2022 Sep 13]. Available from: <https://www.dgkl.de/fileadmin/Verbandsarbeit/Entscheidungsgrenzen/RLE49.zip>
52. Arzideh F, Wolters B, Klauke R. Reference Limit Estimator Handbuch [Internet]. Version RLE 49 20180426. [place unknown]: Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.; [date unknown] [cited 2022 Sep 13]. Available from: https://www.dgkl.de/fileadmin/Verbandsarbeit/Entscheidungsgrenzen/Introduction_and_Installation_de_1.0.pdf
53. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2010 Jan;46(2):270–83.
54. Riechers A, Bosserhoff AK. Melanoma inhibitory activity in melanoma diagnostics and therapy - a small protein is looming large. *Exp Dermatol*. 2014 Jan;23(1):12–4.
55. Narayanan S, Guder WG. Präanalytische Variable und ihr Einfluß auf die Qualität von Laboratoriumsbefunden. *Laboratoriumsmedizin*. 2002 Jun;26(5–6):263–6.
56. Mainali S, Merrill AE, Krasowski MD. Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus. *Pract Lab Med*. 2021 Nov;27:e00259.

57. Mainali S, Davis SR, Krasowski MD. Frequency and causes of lipemia interference of clinical chemistry laboratory tests. *Pract Lab Med*. 2017 Aug;8:1–9.
58. Quantikine ELISA Human MIA Immunoassay Catalog Number DMIA00 [package insert]. [place unknown]: R&D Systems Inc.; 2018.
59. Meites S. Reproducibly Simulating Hemolysis, for Evaluating Its Interference with Chemical Methods. *Clin Chem*. 1973 Nov;19(11):1319.
60. Dimeski G. Interference testing. *Clin Biochem Rev*. 2008 Aug;29 Suppl 1:S43-48.
61. Marques-Garcia F. Methods for Hemolysis Interference Study in Laboratory Medicine - A Critical Review. *EJIFCC*. 2020 Mar;31(1):85–97.
62. Standefer JC, Vanderjagt D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. *Clin Chem*. 1977;23(4):749–51.
63. Lijana RC, Williams MC. Tetramethylbenzidine--a substitute for benzidine in hemoglobin analysis. *J Lab Clin Med*. 1979 Aug;94(2):266–76.
64. Wolters B, Haeckel R. Normalisierte Darstellung von Referenzintervallen und andere Excel-Tools der Arbeitsgruppe ‚Richtwerte‘ der DGKL - ein Arbeitsgruppenbericht. *Klinische Chemie Mitteilungen*. 2012;(Heft 3):110–6.
65. Bahar B, Tuncel AF, Holmes EW, Holmes DT. Method Comparison and Bias Estimation Using R and Shiny [Internet]. [place unknown: publisher unknown]; [cited 2023 Mar 6]. Available from: https://bahar.shinyapps.io/method_compare/
66. Bahar B, Tuncel AF, Holmes EW, Holmes DT. An interactive website for analytical method comparison and bias estimation. *Clin Biochem*. 2017 Dec;50(18):1025–9.
67. Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid-supplemented samples. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):2197–201.
68. Hortin GL, Goolsby K. Lipemia interference with a rate-blanked creatinine method. *Clin Chem*. 1997 Feb;43(2):408–10.
69. Twomey PJ, Don-Wauchope AC, McCullough D. Unreliability of triglyceride measurement to predict turbidity induced interference. *J Clin Pathol*. 2003 Nov;56(11):861–2.
70. Hotakainen K, Tanner P, Alfthan H, Haglund C, Stenman UH. Comparison of three immunoassays for CA 19-9. *Clin Chim Acta*. 2009 Feb;400(1–2):123–7.
71. Bjerner J, Høgetveit A, Wold Akselberg K, Vangsnes K, Paus E, Bjørø T, Børmer OP, Nustad K. Reference intervals for carcinoembryonic antigen (CEA), CA125, MUC1, Alfa-foeto-protein (AFP), neuron-specific enolase (NSE) and CA19.9 from the NORIP study. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(8):703–13.

72. Gomez-Rioja R, Von Meyer A, Cornes M, Costelloe S, Vermeersch P, Simundic AM, Nybo M, Baird GS, Kristensen GBB, Cadamuro J, European Federation of Clinical Chemistry, Laboratory Medicine (EFLM) Working Group Preanalytical Phase (WG-PRE). Recommendation for the design of stability studies on clinical specimens. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Sep 26;61(10):1708–18.
73. Bundesärztekammer (DE). Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen [Internet]. Berlin (DE): Bundesärztekammer (DE); 2019 [modified 2023 Apr 14; cited 2023 Aug 2]. Available from: <https://www.bundesaerztekammer.de/themen/aerzte/qualitaetssicherung/richtlinien-leitlinien-empfehlungen-stellungnahmen>
74. Beaulieu M, Lapointe Y, Vinet B. Stability of PO₂, PCO₂, and pH in fresh blood samples stored in a plastic syringe with low heparin in relation to various blood-gas and hematological parameters. *Clin Biochem*. 1999 Mar;32(2):101–7.
75. Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Schadendorf D. Melanoma tumour markers S100B and MIA: evaluation of stability in serum and blood upon storage and processing. *Br J Dermatol*. 2001 Dec;145(6):1030–1.
76. Raabe A, Kopetsch O, Groß U, Zimmermann M, Gebhart P. Measurements of serum S-100B protein: effects of storage time and temperature on pre-analytical stability. *Clin Chem Lab Med*. 2003 May;41(5):700–3.
77. Roche Diagnostics GmbH. Elecsys S100 Packungsbeilage 08817324500 [Internet]. Version 4.0. Mannheim (DE): Roche Diagnostics GmbH; 2021 [cited 2023 May 17]. Available from: <https://elabdocprod.roche.com/eLD/web/de/de/documents/download/2af3beb2-1e63-ec11-0f91-005056a71a5d> German.
78. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*. 2000 Feb;46(2):306–7.
79. Sodi R, Darn SM, Stott A. Pneumatic tube system induced haemolysis: assessing sample type susceptibility to haemolysis. *Ann Clin Biochem*. 2004 May;41(3):237–40.
80. Streichert T, Otto B, Schnabel C, Nordholt G, Haddad M, Maric M, Petersmann A, Jung R, Wagener C. Determination of hemolysis thresholds by the use of data loggers in pneumatic tube systems. *Clin Chem*. 2011 Oct;57(10):1390–7.
81. Kruger D. The assessment of jaundice in adults: tests, imaging, differential diagnosis. *JAAPA*. 2011 Jun;24(6):44–9.
82. Farrell CJL, Carter AC. Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem*. 2016 Sep;53(5):527–38.
83. Daugherty NA, Hammond KB, Osberg IM. Bilirubin interference with the kinetic Jaffé method for serum creatinine. *Clin Chem*. 1978 Feb;24(2):392–3.

84. Dorwart WV. Bilirubin interference in kinetic creatinine determination. *Clin Chem.* 1979 Jan;25(1):196–7.
85. Knapp ML, Hadid O. Investigations into negative interference by jaundiced plasma in kinetic Jaffé methods for plasma creatinine determination. *Ann Clin Biochem.* 1987 Jan;24(1):85–97.
86. Owen LJ, Keevil BG. Does bilirubin cause interference in Roche creatinine methods? *Clin Chem.* 2007 Feb;53(2):370–1.
87. Alvarez YF, Kelliher MT, Hubbard JA, Nerenz RD, Cervinski MA. Reevaluating the Icterus Index Cutoff of a Jaffé Creatinine Method. *J Appl Lab Med.* 2022 Sep 1;7(5):1151–7.
88. Cattozzo G, Franzini C, Galletta G, Luraschi P, Morelli AM. Importance of using soluble derivatives in assessing bilirubin interference: the example of gamma-glutamyltransferase. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990;48(10):742–4.
89. Franzini C, Morelli AM, Cattozzo G. Use of a synthetic soluble bilirubin derivative to assess interference in creatinine measurements. *Clin Chem.* 1991 Feb;37(2):236–8.
90. Uldall A, Loikkanen M, Olafsdottir E, Örnemark U, Nordin G, Steensland H. Nordic interference study, March 2002 - effects of haemoglobin and bilirubin on some common serum analysis [Internet]. [place unknown]: Nordic Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine; 2003 [cited 2023 May 17]. Available from: https://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Interfer_hem_bil.pdf
91. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb).* 2014;24(1):57–67.
92. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994 Nov;40(11 Pt 1):1996–2005.
93. Nanji AA, Poon R, Hinberg I. Lipaemic interference: effects of lipaemic serum and intralipid. *J Clin Pathol.* 1988 Sep;41(9):1026–7.
94. Saracevic A, Dukic L, Simundic AM. Haemolysis and lipemia interfere with resistin and myeloperoxidase BioVendor ELISA assays. *Biochem Med (Zagreb).* 2019 Jun 15;29(2):020703.
95. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov;36(6):704–21.
96. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942–56.
97. Warade J. Retrospective Approach to Evaluate Interferences in Immunoassay. *EJIFCC.* 2017 Oct;28(3):224–32.

98. Hennig C, Rink L, Fagin U, Jabs WJ, Kirchner H. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *J Immunol Methods*. 2000 Feb 21;235(1–2):71–80.
99. Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, Rossi JF, Wijdenes J, Bataille R, Klein B, Brochier J. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clin Exp Immunol*. 1994 Nov;98(2):323–9.
100. Lind P, Langsteger W, Költringer P, Dimai HP, Passl R, Eber O. Immunoscintigraphy of inflammatory processes with a technetium-99m-labeled monoclonal antigranulocyte antibody (MAb BW 250/183). *J Nucl Med*. 1990 Apr;31(4):417–23.
101. Lind P, Lechner P, Arian-Schad K, Klimpfing M, Cesnik H, Kammerhuber F, Eber O. Anti-carcinoembryonic antigen immunoscintigraphy (technetium-99m-monoclonal antibody BW 431/26) and serum CEA levels in patients with suspected primary and recurrent colorectal carcinoma. *J Nucl Med*. 1991 Jul;32(7):1319–25.
102. Kroll MH, Ruddel M, Blank DW, Elin RJ. A model for assessing interference. *Clin Chem*. 1987 Jul;33(7):1121–3.
103. Florkowski C, Wallace J, Walmsley T, George P. The effect of hemolysis on current troponin assays--a confounding preanalytical variable? *Clin Chem*. 2010 Jul;56(7):1195–7.
104. Smit LHM, Korse CM, Bonfrer JMG. Comparison of four different assays for determination of serum S-100B. *Int J Biol Markers*. 2005;20(1):34–42.
105. Li C, Liu J, Jiang L, Xu J, Ren A, Lin Y, Yao G. The value of melanoma inhibitory activity and LDH with melanoma patients in a Chinese population. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Feb 26;100(8):e24840.
106. Datz E, Zeman F, Koller M, Szeimies RM, Berneburg M, Landthaler M, Bosserhoff AK, Karrer S. Phototherapy-induced elevation of serum level of melanoma inhibitory activity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2019 Jul;35(4):255–60.
107. Holdenrieder S, Molina R, Gion M, Gressner A, Troalen F, Auge JM, Zancan M, Wycislo M, Stieber P. Alternative antibody for the detection of CA125 antigen: a European multicenter study for the evaluation of the analytical and clinical performance of the Access OV Monitor assay on the UniCel Dxl 800 Immunoassay System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(5):588–99.
108. Stieber P, Molina R, Gion M, Gressner A, Troalen F, Holdenrieder S, Auge JM, Zancan M, Wycislo M, Jarrige V. Alternative antibody for the detection of CA19-9 antigen: a European multicenter study for the evaluation of the analytical and clinical performance of the Access GI Monitor assay on the UniCel Dxl 800 Immunoassay System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(5):600–11.

109. Molina R, Gion M, Gressner A, Troalen F, Auge JM, Holdenrieder S, Zancan M, Wycislo M, Stieber P. Alternative antibody for the detection of CA15-3 antigen: a European multicenter study for the evaluation of the analytical and clinical performance of the Access BR Monitor assay on the UniCel Dxl 800 Immunoassay System. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(5):612–22.
110. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983 Nov;21(11):709–20.
111. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21(1):49–52.
112. Slev PR, Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of seven automated CA 15-3 assays. *Am J Clin Pathol*. 2006 May;125(5):752–7.
113. Meany DL, Chan DW. Comparability of tumor marker immunoassays: still an important issue for clinical diagnostics? *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(5):575–6.
114. Ekins R. Immunoassay standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1991;205:33–46.
115. Roche Diagnostics GmbH. MIA ELISA package insert Cat. No. 11976826001 [Internet]. Version 09. Mannheim (DE): Roche Diagnostics GmbH; 2020 [cited 2023 May 22]. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/de/de/documents/download/f1ebabee-003b-eb11-0091-005056a772fd>
116. Hau P, Wise P, Bosserhoff AK, Blesch A, Jachimczak P, Tschertner I, Bogdahn U, Apfel R. Cloning and characterization of the expression pattern of a novel splice product MIA (splice) of malignant melanoma-derived growth-inhibiting activity (MIA/CD-RAP) [corrected]. *J Invest Dermatol*. 2002 Sep;119(3):562–9.
117. Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines Das R. Reference reagents for prostate-specific antigen (PSA): establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). *Clin Chem*. 2000 Sep;46(9):1310–7.
118. Bosserhoff AK, Küster H, Hein R. Elevated MIA levels in the serum of pregnant women and of children. *Clin Exp Dermatol*. 2004 Nov;29(6):628–9.
119. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988. 567 p.
120. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016 Jan;23(1):19–28.
121. Matías-García PR, Wilson R, Guo Q, Zaghlool SB, Eales JM, Xu X, Charchar FJ, Dormer J, Maalmi H, Schlosser P, Elhadad MA, Nano J, Sharma S, Peters A, Fornoni A, Mook-Kanamori DO, Winkelmann J, Danesh J, Di Angelantonio E, Ouwehand WH, Watkins NA, Roberts DJ, Petrera A, Graumann J, Koenig W, Hveem K, Jonasson C, Köttgen A, Butterworth A, Prunotto M, Hauck SM, Herder

- C, Suhre K, Gieger C, Tomaszewski M, Teumer A, Waldenberger M, Human Kidney Tissue Resource. Plasma Proteomics of Renal Function: A Transethnic Meta-Analysis and Mendelian Randomization Study. *J Am Soc Nephrol*. 2021 Jul;32(7):1747–63.
122. PetitClerc C, Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987 Dec;170(2–3):S1–11.
123. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem*. 1971 Apr;17(4):275–84.
124. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V, Näher H. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1891–6.
125. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: a user's guide. Washington, DC: AACCC Press; 2005. 123 p.
126. Barth JH. Reference ranges still need further clarity. *Ann Clin Biochem*. 2009 Jan;46(Pt 1):1–2.

8 POSTERBEITRAG

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab auf dem Deutschen Kongress für Laboratoriumsmedizin 2023 unter dem Titel „Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung der Melanoma Inhibitory Activity (MIA) Konzentration im Serum“ vorgestellt und im Abstractband veröffentlicht:

German Congress of Laboratory Medicine: 18th Annual Congress of the DGKL and 5th Symposium of the Biomedical Analytics of the DVTA e. V. Journal of Laboratory Medicine. 2023;47(5):eA1–85.

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei mehreren Personen bedanken, die mich im Rahmen der Promotion unterstützt haben. Herrn Prof. Dr. Ralph Burkhardt danke ich für die Möglichkeit die Promotion am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchzuführen, sowie für die sehr gute fachliche Betreuung. Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Stefan Wallner für die Überlassung des Themas und die stetige ausgezeichnete fachliche Betreuung. Bei Herrn Prof. Dr. Schreml bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Wimmer für die technische Unterstützung bei der laborinternen Datenbank Abfrage bedanken, und bei Herrn Zeman für die statistische Methodenberatung. Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitenden am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, insbesondere den Mitarbeiterinnen des immunologischen Speziallabors und des Studienlabors, für die Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und stets freundliche Arbeitsatmosphäre.