

Aus dem Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

EVALUATION DER SIMULTANMESSUNG VON VIER
IMMUNSUPPRESSIVA MITTELS LC-MS/MS IM
VERGLEICH ZUR BESTIMMUNG MITTELS
IMMUNOASSAY:
ANALYTIK, KOSTEN/NUTZEN-RELATION UND
KLINISCHE BRAUCHBARKEIT

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Eva-Maria Vogelsberg

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Fritz Boege

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Udo Boeken

Zusammenfassung

Nach einer Organtransplantation benötigt der Patient zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion des Organs Immunsuppressiva. Da aus einem zu niedrigen Blutspiegel der Immunsuppressiva Abstoßungsreaktionen des Körpers gegen das Organ und aus einem zu hohen Spiegel schwerwiegende Infektionen und Nebenwirkungen folgen können, ist ein sorgfältiges Drug Monitoring essenziell. Um dies zu verbessern, soll im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf auf eine neue Bestimmungsmethode umgestellt werden, die LC-MS/MS.

Ziel meiner Untersuchung war (i) die Etablierung der LC-MS/MS-Methodik einschließlich automatisierter Probenvorbereitung für die Bestimmung der Blutspiegel der Immunsuppressiva CSA, TAC, SIR und EVE, (ii) der Ergebnisvergleich mit den bisher für diese Analysen eingesetzten Immunoassays und (iii) die Bewertung der neuen Methodik hinsichtlich Messqualität, Prozessorganisation, Ökonomie und möglichen Auswirkung auf die Patientenversorgung.

Die dafür herangezogenen Proben waren entweder vorkonfektionierte Kontrollen und Kalibratoren, wurden aus Reinslösungen selbst hergestellt oder waren dem Labor zur Analyse eingesendete Blutproben von Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf, die mit Immunsuppressiva behandelt wurden. In der technischen Evaluation wurden für die Präzision der LC-MS/MS-Methodik Variationskoeffizienten von unter neun Prozent gefunden und über die gesamten klinisch relevanten Messbereiche eine gute Linearität beobachtet. Im Vergleich mit den bisher eingesetzten Immunoassays fanden sich für Reinslösungen und Patientenproben gute Korrelationen der Messwerte. Allerdings lagen die Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen systematisch niedriger. Aus der ökonomischen Analyse ging hervor, dass sich die Investivkosten der LC-MS/MS-Analytik aufgrund der geringeren Verbrauchskosten bei dem erwarteten Probendurchsatz nach spätestens 4,858 Jahren amortisieren werden. Die Prozessanalyse ergab einen geringeren *hands-on*-Zeitbedarf für die Messdurchführung selber bei insgesamt längerer Probenverweildauer und Messzeit im Gerät, sodass *per saldo* der *turn-around* länger wird und die Ergebnisse den betreuenden Ärzten erst später zur Verfügung stehen. Welche Auswirkungen diese Änderungen in ihrer Gesamtheit auf das klinische Ergebnis und die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen und Nebenwirkungen haben, wurde nicht untersucht.

Abstract

Following organ transplantation, regular treatment with immunodepressants is required to prevent immunological transplant rejection. Given their rather narrow therapeutic margin, immunodepressant drugs require careful dose monitoring: Insufficient blood levels will allow for transplant rejection, while too high blood levels can encompass toxic side effects and/or entail serious infections due to severe immunodeficiency.

The aim of this study was to establish and evaluate therapeutic drug monitoring by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, which is considered superior to immunoassays currently in use. This work encompassed establishment of the LC-MS/MS methodology including automated sample preparation for routine measurements of the clinically relevant immunodepressant drugs CSA, TAC, SIR und EVE, technical evaluation of the new method, comparison of results with currently used immunoassays and evaluation of the impact that method migration has on laboratory logistics, patient management and analytic cost effectivity.

Analytic samples used for the study were either standards and controls commercially available, or self-prepared dilutions of pure immunodepressant substances, or blood samples submitted to the laboratory for routine determination of the above immunodepressant drugs.

Technical evaluation of the LC-MS/MS methodology showed a good precision and linearity across the entire relevant measuring range. Comparison with immunoassays showed a good correlation of results. However, the values obtained by LC-MS/MS were in general lower than those determined by immunoassays. Economic evaluation showed that amortization of invest on LC-MS/MS equipment will be obtained after less than five years, due to the price per determination being much lower. According to our study disadvantageous features of LC-MS/MS-determinations encompassed a higher demand on schooling time of technical laboratory staff, despite reduction of *hands-on-time* and a longer *turn-around-time* extending the time lapse until results are available to the treating physicians.

It remains to be seen whether method migration to LC-MS/MS determination leading to the report of lower apparent drug levels compared to determination by immunoassays will have an effect on the frequency of rejection reactions and other side effects.

Abkürzungsverzeichnis

CSA	Ciclosporin A
CV	Variationskoeffizient (engl. <i>Coefficient of variation</i>)
CYP	Cytochrom P
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrosprayionisation
EVE	Everolimus
FKBP-12	FK506-Bindungsprotein 12
Hands-on-Zeit	Personalbindungsminuten bei Messungen im Labor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
IL-2	Interleukin-2
KI	Konfidenzintervall
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-Kopplung
Left-Over	Nach allen Messungen übrig gebliebenes Blut
Max.	Maximum
MD	Median
Min.	Minimum
MS	Massenspektrometrie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Anzahl bestimmter Werte
SIR	Sirolimus
SD	Standardabweichung
TAC	Tacrolimus
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
Turn-around-Zeit	Zeit von der Indikationsstellung bis zur Befundfreigabe eines zu bestimmenden Wertes

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Historisches.....	2
1.3. Immunsuppressiva	3
1.3.1. CSA.....	4
1.3.2. TAC.....	5
1.3.3. SIR.....	6
1.3.4. EVE	7
1.4. Überwachung der Immunsuppressiva-Spiegel	8
1.5. Dosierung und therapeutische Bereiche.....	9
2. Zielsetzung	10
3. Material und Methoden	11
3.1. LC-MS/MS	11
3.1.1. Allgemeines.....	11
3.1.2. Blutabnahme und Patientenkollektiv	11
3.1.3. Pipettierroboter.....	12
3.1.4. HPLC.....	13
3.1.5. MS/MS	14
3.1.6. Normwerte.....	18
3.2. ECLIA-Immunoassay	20
3.2.1. Allgemeines.....	20
3.2.2. Normwerte.....	22

3.3.	Methodik der Evaluierung	22
3.4.	Methodik des Methodenvergleichs	24
3.5.	Statistik	25
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Evaluierung	27
4.1.1.	Serienpräzision	27
4.1.2.	Tag-zu-Tag-Präzision	29
4.1.3.	Patientenvergleich	33
4.1.4.	Linearität	40
4.2.	Methodenvergleich	43
4.2.1.	Patientenverfolgung	43
4.2.2.	Zeitmanagement und Testverfügbarkeit	46
4.2.3.	Wirtschaftlichkeit	48
5.	Diskussion	50
5.1.	Diskussion der Methodik	50
5.1.1.	Patientenkollektiv	50
5.1.2.	Pipettierroboter	51
5.1.3.	LC-MS/MS	52
5.1.4.	Immunoassay	53
5.1.5.	Evaluierung	54
5.1.6.	Methodenvergleich	55
5.1.7.	Statistik	56
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	56
5.2.1.	Evaluierung	56
5.2.2.	Methodenvergleich	58
5.3.	Ausblick	60
6.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	61
6.1.	Tabellenverzeichnis	61

6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	63
7.	Anhang	66
7.1.	Hilfe für Hamilton-Pipettierroboter und Analyst.....	66
7.2.	Herstellung der Patientenproben und der eigenen Vollblut-Kontrollen	69
7.3.	Referenzbereiche der Kontrollen und Kalibratoren.....	71
7.4.	Differenzenplots der Patientenvergleiche	72
7.5.	Ergebnisse und Level der Linearität	76
7.6.	Ethikvotum.....	78
8.	Danksagung.....	79
9.	Lebenslauf	80
10.	Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Im Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf werden die klinischen Messungen der Immunsuppressiva-Talspiegel derzeit mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-Kopplung und Elektrosprayionisation (ESI-LC-MS/MS) durchgeführt. Bisher wurden für diesen Zweck die Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (ECLIA) verwendet.

Bei der Elektrochemilumineszenz (ECL) wird an den zu messenden Immunkomplex, der durch einen Sandwich-Immunoassay gebildet worden ist, ein Ruthenium-Tracer gekoppelt, der im nächsten Schritt Licht abgeben kann. Dieses Licht kann quantitativ gemessen werden [1].

Ziel meiner Arbeit war die Einführung einer neuen Messtechnologie, der LC-MS/MS. Hierbei werden zwei unabhängig voneinander funktionierende analytische Systeme, die Flüssigkeitschromatographie und die Massenspektrometrie (MS), miteinander verbunden. Zunächst werden die zu messenden Bestandteile vom flüssigkeitschromatischen System von Verunreinigungen der Blutprobe abgetrennt, danach mittels Ionenquelle ionisiert, um anschließend in der MS stoffspezifisch quantifiziert werden zu können [2].

Diese Dissertation behandelt die Vorgehensweise zur Etablierung der LC-MS/MS und einen Vergleich der beiden Methoden bezüglich der analytischen Leistung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse, um ein bestmögliches klinisches Monitoring von Immunsuppressiva-Spiegeln bei Patienten gewährleisten zu können. Begleitend werden die Auswirkungen des Wechsels auf die LC-MS/MS-Methodik hinsichtlich des Qualitätsmanagements und Finanzcontrollings bewertet.

Es wurden simultan vier Immunsuppressiva evaluiert. Ciclosporin, eher bekannt als Ciclosporin A (CSA) wird unter den Namen *Cicloral*® und *Immunosporin*® verkauft. Hinter den Handelsnamen *Prograf*®, *Advagraf*®, *Mofigraf*® und *Protopic*® verbirgt sich das Makrolidlacton Tacrolimus (TAC). Außerdem wurden noch Rapamycin und sein Derivat, Sirolimus (SIR) und Everolimus (EVE) evaluiert. Letztere werden unter den Namen *Rapamune*® und *Certican*® in den Kliniken eingesetzt. Diese vier Immunsuppressiva haben verschiedene Wirkmechanismen und greifen somit an verschiedenen Stellen in den Regelkreis der T-Zellaktivierung und -proliferation ein.

1.2. Historisches

Die wichtigste Indikation für eine Immunsuppressiva-Gabe stellen die Organtransplantationen dar.

Die Überlegung Organe zu transplantieren ist keine Idee der Neuzeit. Einige Mythen erzählen schon von Hauttransplantationen in vorchristlicher Zeit. Lange wurde mit Haut-, Hoden-, Knochen- und Knorpeltransplantationen experimentiert, bis 1883 zum ersten Mal Schilddrüsengewebe transplantiert werden konnte. Nach und nach folgten die Übertragungen von Nieren- (1884), Pankreas- (1892) und Milzgewebe (1897) [3].

Drei grundlegende Problematiken verhinderten für lange Zeit den Erfolg der Transplantation solider Organe. Erstens waren die chirurgischen Techniken noch nicht vollständig ausgereift, zweitens fehlten Erkenntnisse zur Gewebekompatibilität und den für Abstoßungsreaktionen wesentlichen *human leukocyte antigens* (HLA) und drittens waren noch keine immunsuppressiven Substanzen bekannt, mit denen man Abstoßungsreaktionen hätte verhindern können [4]. Die ersten Versuche zur Immunsuppression nach Transplantationen erfolgten 1949 mit Glukokortikoiden. Es folgte das Immunsuppressivum Azathioprin das erstmals 1958 an Kaninchen zur Unterdrückung von Antikörperbildung eingesetzt wurde [5].

Die erste erfolgreiche Transplantation am Menschen wurde 1954 von dem Chirurgen Joseph Murray als Nierentransplantation an Zwillingen durchgeführt. Eben dieser Chirurg schaffte es 1959 auch die erste Niere zwischen nicht genetisch identischen Brüdern zu transplantieren [4]. Jedoch erst durch den Beginn des klinischen Einsatzes von Azathioprin (1960) und der Identifizierung von HLA-Genen (1958) konnte das Langzeitüberleben nach Transplantation gesteigert werden. Zügig folgten die erste Lungentransplantation 1963 und die jeweils erste Herz-, Pankreas- und Lebertransplantation im Jahre 1966. 1983 wurde das Immunsuppressivum CSA für die klinische Anwendung zugelassen [4].

Seitdem wurden eine Reihe weiterer Immunsuppressiva eingeführt und begleitend in der Organtransplantation eingesetzt und es zeigte sich, dass die meisten dieser Substanzen im klinischen Einsatz gut verträglich sind, wenn man die Dosierung durch Blutspiegel-Messungen sorgfältig optimiert und überwacht (für eine Übersicht siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht einiger Immunsuppressiva und deren Zulassungen

Substanz	Jahr	Bemerkung
Glukokortikoide	1949	Erste Versuche der Immunsuppression
Azathioprin	1960	Erste klinische Anwendung
Methotrexat	1960- 1970	Erste Erfahrungsberichte für Verwendung bei schwerer Psoriasis und rheumatischer Arthritis, seit Mitte der 80er etabliertes Antirheumatikum
CSA	1983	Klinische Anwendung mit deutlicher Verbesserung der Überlebenschancen nach Organtransplantation
TAC	1994	Zulassung in den USA
Mycophenolsäure/ Mycophenolat	1996	Zulassung in den USA als immunsuppressive Substanz nach Organtransplantationen (bzw. vorher schon zum Gebrauch gegen Psoriasis)
Leflunomid	1999	Zulassung für rheumatische Arthritis in Deutschland
Antikörper	1998- 1999	Erste Zulassungen für Antikörper (Basiliximab und Daclizumab) gegen Interleukin 2 (IL-2) für Immunsuppression nach Organtransplantation
SIR	1999	Zulassung in den USA als immunsuppressive Substanz
EVE	2003	Zulassung in Kombi mit CSA in reduzierter Dosis in der EU, 2004 in Deutschland für die Herz- und Nierentransplantation

3

Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[4-13]

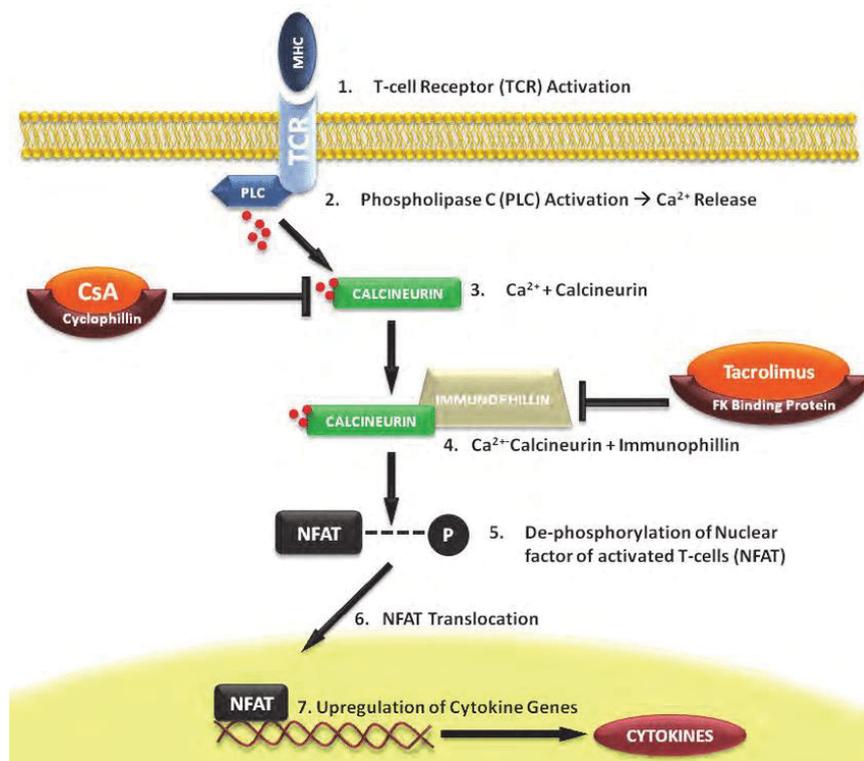
1.3. Immunsuppressiva

Immunsuppressiva sind eine Medikamentengruppe, die das körpereigene Abwehrsystem unterdrücken sollen. Eine grundsätzliche Nebenwirkung aller Immunsuppressiva ist folglich eine erhöhte Infektanfälligkeit, die unter Umständen sogar zum Tod führen kann. Eine weitere gefährliche Nebenwirkung ist z.B. das vermehrte Auftreten eines Karzinoms der Haut [14, 15]. Zu den bedeutsamsten Vertreter dieser Medikamentengruppe gehören

die entzündungshemmenden Stoffe z.B. Glukokortikoide, zytotoxische Medikamente (Radiomimetika und Antimetaboliten, wie Cyclophosphamid und Methotrexat), Antikörper gegen den Tumor-Nekrose-Faktor und die aus Pilzen gewonnenen Calcineurin-Antagonisten CSA und TAC [16]. Hinzugetreten sind in den letzten 20 Jahren außerdem das ursprünglich aus Flechten gewonnene Rapamycin, bzw. dessen Derivat SIR, und EVE. Beide greifen in *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-vermittelte Signalwege ein [17, 18].

1.3.1. CSA

Die Immunsuppressiva CSA und TAC gehören zu den Calcineurin-Inhibitoren. Calcineurin ist eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Phosphatase, die die Translokation von *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) in den Zellkern und damit die Expression von IL-2 induziert [19, 20]. Eine Hemmung von Calcineurin verhindert somit die IL-2-abhängige T-Zell-Aktivierung (siehe Abbildung 1).



4

Abbildung 1: Eingriff von CSA und TAC in die intrazelluläre Signalkaskade durch Hemmung von Calcineurin und daraus resultierender Inhibition der T-Zell-Aktivierung

(<https://www.intechopen.com/books/chronic-kidney-disease-and-renal-transplantation/mechanisms-of-calcineurin-inhibitor-nephrotoxicity-in-chronic-allograft-injury> mit freundlicher Genehmigung von Tara McMorow © Craig Slattery, Hilary Cassidy, Olwyn Johnston, Michael P. Ryan and Tara McMorow (February 10th 2012). Mechanisms of Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Chronic Allograft Injury, Chronic Kidney Disease and Renal Transplantation, Manisha Sahay, under CC BY 3.0 license IntechOpen, DOI: 10.5772/25778 [21])

Die Hemmung des Calcineurins wird durch eine Komplexbildung aus CSA und Cyclophilin verursacht [22]. CSA wurde 1976 aus der Pilzgattung *Trichoderma polysporum* als antimykotisch wirkendes Antibiotikum isoliert [23]. Erst sieben Jahre später wurde es für die Immunsuppression nach Organtransplantation verwendet und führte dort zu großen Fortschritten.

Ein großes Problem war und ist jedoch die schwerwiegende Nephrotoxizität, die durch irreversible und progressive tubulo-interstitielle Schäden und glomeruläre Sklerose verursacht wird. Außerdem wird eine reversible Verringerung der GFR verzeichnet [19, 24]. Weitere Nebenwirkungen sind Beeinträchtigungen des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, Hypertonie, Malignome, Hypertrichose, Tremor und wie bei allen Immunsuppressiva Infektionen [24-26].

CSA gelangt per Diffusion an seinen Wirkort und wird von dort durch das ATP-abhängige Transportprotein Glykoprotein P wieder wegtransportiert [25, 27]. Dieser Mechanismus birgt das Potential zahlreicher Wechselwirkungen. Durch Inhibitoren des Glykoprotein P erhöht sich der Wirkstoffspiegel von CSA, durch Induktoren erniedrigt sich der Spiegel, was im schlimmsten Fall zu einer Transplantatabstoßung führen kann. Typische Inhibitoren des Glykoprotein P sind zum Beispiel Verapamil, Spironolacton oder Amiodaron, während Rifampicin, Johanniskraut oder Dexamethason zu den Induktoren zählen. Beachten sollte man auch, dass sich hinsichtlich der Ausprägung und Aktivität des Transportproteins interindividuelle Unterschiede ergeben [25, 27-29]. Dies ist einer der Gründe für die Notwendigkeit eines *therapeutic drug monitoring* (TDM) der Substanz.

5

1.3.2. TAC

TAC gehört ebenfalls zu den Calcineurin-Inhibitoren. Der Wirkmechanismus ähnelt dem von CSA, es bindet jedoch anstatt an Cyclophilin an das zytoplasmatische Immunophilin FK506-Bindungsprotein 12 (FKBP-12). Dieser Komplex von TAC und FKBP-12 verhindert nun wiederum die Translokation von NFAT in den Zellkern und die Expression von Zytokinen (siehe Abbildung 2) [19, 20].

Das Immunsuppressivum ist ein Makrolidantibiotikum und wurde aus dem Pilz *Streptomyces Tsukubaniensis* isoliert. 1995 wurde es, nach erfolgreicher Anwendung in den USA, Japan und England, auch in Deutschland für die Immunsuppression nach Lebertransplantation eingesetzt. Es zeichnet sich durch eine lange Halbwertszeit (HWZ) von etwa 9-16h aus [30].

Dieser Calcineurin-Inhibitor zeigt in-vitro eine wesentlich höhere Potenz als CSA, sodass es gerne als *Rescue*-Therapie bei Transplantatabstoßungen unter CSA-Therapie verwendet wird [30, 31].

TAC wird durch das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) verstoffwechselt. Dies bedeutet, dass CYP-Inhibitoren, wie zum Beispiel Erythromycin, Fluconazol oder Grapefruitsaft den Blutspiegel von TAC erhöhen und damit seine Wirkung und etwaige Nebenwirkungen verstärken können. Andersherum gilt aber auch, dass CYP-Induktoren wie Johanniskraut, Phenobarbital, Cotrimoxazol oder Carbamazepin die Wirkspiegel und Wirkung mindern können [29].

Zu beachten ist die Nephrotoxizität von TAC. Außerdem zählen Hypertonie, dosisabhängige Neurotoxizität und die Bildung eines posttransplantationsabhängigen Diabetes Mellitus zu den wichtigsten Nebenwirkungen [30]. Es kommen unter der Therapie mit TAC mehr Nebenwirkungen vor als unter CSA, dafür gibt es jedoch bei niedrigerer Dosierung weniger Transplantatabstoßungen [32].

1.3.3. SIR

SIR und EVE bilden die Gruppe der sogenannten mTOR-Inhibitoren. Diese greifen im Gegensatz zu den anderen beiden Immunsuppressiva in die späte Phase der T-Zellproliferation und -aktivierung hemmend ein [7].

Sirolimus ist der generische Begriff für die natürliche Substanz Rapamycin. Isoliert aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus*, wurde es zunächst als Makrolidantibiotikum, Zytostatikum und Antimykotikum eingesetzt, bevor seine immunsuppressiven Wirkungen bekannt wurden [7]. Die mTOR-Inhibitoren bilden ebenfalls einen intrazellulären Komplex mit FKBP-12. Dieser Komplex inhibiert nun die Kinase mTOR, sodass durch die Verhinderung der darauffolgenden intrazellulären Signalkaskade die Zelle in einen Arrest in der G1- und S-Phase versetzt wird [7, 33, 34]. Siehe dazu auch Abbildung 2 und 3.

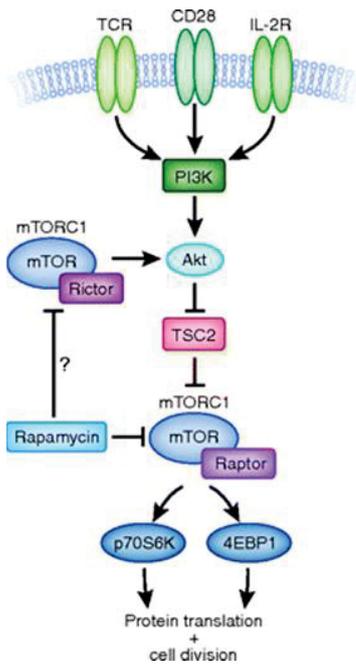


Abbildung 2: Eingriff von Rapamycin in die intrazelluläre Signalkaskade über Hemmung von mTOR und daraus resultierender Arrest der Zelle in der G1-Phase und S-Phase
 (<https://jasn.asnjournals.org/content/22/3/408/tab-figures-data>, mit freundlicher Genehmigung von Bob Henkel [35])

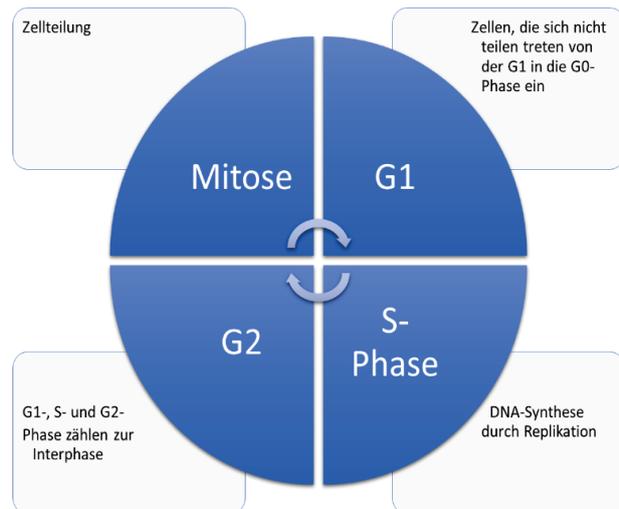


Abbildung 3: Übersicht Zellzyklus bei Eukaryoten; bei Eingriff der mTOR-Inhibitoren in den Zellzyklus wird ein Arrest in der G1- und S-Phase der Zellen initiiert
 (Eigene Darstellung 2020 unter Verwendung folgender Literatur: [36])

SIR wird bei Patienten häufig in Kombination mit Calcineurin-Inhibitoren eingesetzt, um die Dosis der Letztgenannten reduzieren zu können. Dadurch hat sich in der Vergangenheit die Nierenfunktion dieser Patienten verbessern lassen [33].

Nebenwirkungen von SIR sind eine reversible Erniedrigung von Blutplättchen und Leukozyten und eine Erhöhung des Cholesterinspiegels. Keine unerwünschten Wirkungen zeigt der mTOR-Inhibitor auf den Blutdruck, die Nieren- und Leberfunktion und den Triglyceridspiegel. Die Nephrotoxizität bei Kombination mit einem Calcineurin-Inhibitor hängt vor allem von dessen Dosis ab und nicht von der Dosis des SIR [37].

Verstoffwechselt wird SIR durch Cyp3A4 und transportiert über Glykoprotein P, daher müssen die Wechselwirkungen in Bezug auf diese Enzyme bei der Gabe dringend bedacht werden [38, 39]. Das Immunsuppressivum hat eine sehr lange HWZ von circa 62h [40].

1.3.4. EVE

EVE zählt zu den mTOR-Inhibitoren. Es ist ein synthetisches Derivat von Rapamycin, wird jedoch durch eine Hydroxyethyl-Gruppe hydrophiler [7] und damit besser und schneller oral verfügbar [18]. Es ist seiner Ursprungssubstanz in Wirkungsweise,

Nebenwirkungsprofil und Interaktionen mit anderen Arzneimitteln sehr ähnlich [41], hat jedoch im Gegensatz zu der sehr langen HWZ der Ursprungssubstanz nur eine HWZ von 17h [42]. EVE zeigt *in-vitro* eine geringere immunsuppressive Aktivität bei niedrigerer Bindungsaktivität an das zytoplasmatische FKBP-12. *In-vivo* zeigt es jedoch eine gleichwertige immunsuppressive Wirkung zu SIR [7].

1.4. Überwachung der Immunsuppressiva-Spiegel

Die Überwachung der Immunsuppressiva-Spiegel nimmt eine zentrale Rolle in der Betreuung eines Patienten nach Organtransplantation ein. Sind die Spiegel zu niedrig

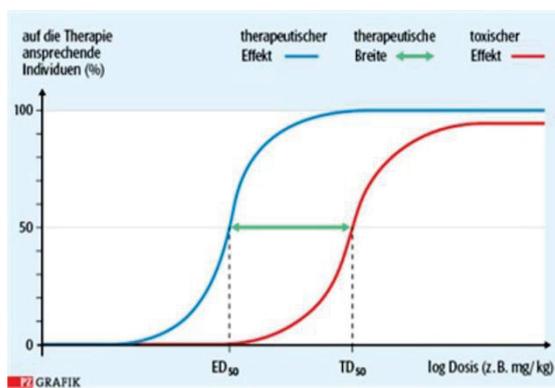


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der therapeutischen Breite eines Arzneistoffes, die zwischen der Grenze des therapeutischen und toxischen Effektes liegt

(<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-292018/arzneimitteltherapie-nach-mass/>, mit freundlicher Genehmigung von Stephan Spitzer [44])

könnte das Spender-Organ vom Empfänger-Immunsystem angegriffen und abgestoßen werden. Sind die Spiegel jedoch zu hoch drohen schwere Infektionen. Daher ist das Monitoring der Spiegel (TDM) essenziell, um den Balanceakt zwischen minimaler Medikamententoxizität und maximaler Organakzeptanz durch das Abwehrsystem des Empfängers zu schaffen [43]. Ein Schema zum therapeutischen Bereich findet man unter der Abbildung 4.

Ein Monitoring ist immer dann sinnvoll, wenn von einer Medikamentengabe in einer bestimmten Dosis keine Rückschlüsse auf die Wirkung gezogen werden können und/oder die therapeutische Breite der Medikamente gering ist [42]. Beides ist bei den Immunsuppressiva der Fall, da sich unter anderem über Verstoffwechslungen durch CYP3A4 und Abtransport via Glykoprotein P eine große interindividuelle Variabilität ergibt. Wichtig beim Monitoring ist, dass ein geeignetes Analysesystem zur Verfügung steht und nicht zwischen verschiedenen Systemen gewechselt wird, da dies die Verlaufsbeurteilung verfälscht. Außerdem sollten immer Tal- oder Spitzenspiegel gemessen werden, auch hier sollte es nicht zum Wechsel kommen. „Die Ermittlung der Gesamtexposition innerhalb eines Dosierungsintervalls gilt als Goldstandard“ [45].

Das Prinzip der MS ist schon über 120 Jahre alt. Joseph John Thomson beschrieb dieses im Jahr 1897. Schnell verbreitete sich diese Technik, die für die Medizin jedoch lange

uninteressant blieb, da es schwierig war biologisches Material zu ionisieren [46]. In den frühen 1960er Jahren wurden die ersten analytischen Systeme erfunden, die niedrige Konzentrationen der Immunsuppressiva im Blut messen konnten [47, 48]. Ende der 60er Jahre wurde mit der Forschung an der MS-Analytik erneut begonnen. 2002 erhielt John B. Fenn den Chemie-Nobelpreis für die ESI [2, 46]. Das TDM wird heutzutage am häufigsten mit Hilfe von Immunoassays oder MS durchgeführt [49].

1.5. Dosierung und therapeutische Bereiche

Gegenwärtig wird zur Erhaltungstherapie nach Organtransplantation meist eine Triple-Therapie, bestehend aus Immunsuppressivum, Antimetaboliten und Glukokortikoiden, gewählt [48, 50]. Wichtig ist, dass es keine allgemeingültigen therapeutischen Bereiche gibt. Diese sind immer auch abhängig vom Transplantationstyp und klinischen Zustand des Patienten und des Transplantats [48, 51].

Für CSA gilt eine Anfangsdosis von 3-6 mg/kgKG/Tag. Die ersten drei Monate nach der Organtransplantation soll der Blutspiegel zwischen 150-250 µg/l, ab drei Monaten zwischen 150-200 µg/l liegen. Nach sechs Monaten kann die Dosis vorsichtig reduziert werden, bis man nach zwölf Monaten nur noch ein Spiegel zwischen 60-100 µg/l empfohlen wird [50].

Bei Einnahme von TAC wird mit einer Dosis von 0,1-0,2 mg/kgKG/Tag begonnen. Der Zielspiegel sollte während der Initialtherapie zwischen 8-12 µg/l liegen. Zur Erhaltungstherapie wählt man einen etwas niedrigeren Spiegel zwischen 6-8 µg/l. Nach 12 Monaten kann der Zielspiegel für die Erhaltungstherapie sogar nochmal um 1 µg/l gesenkt werden (Zielbereich: 5-7 µg/l) [50].

SIR wird initial meist in Kombination mit CSA und einem Glukokortikoid eingesetzt. Die Initialdosis beträgt 2 mg/Tag nach einer einmaligen Anfangsdosis von 6 mg. Danach wird die Dosis an den Zielspiegel angepasst, der optimalerweise zwischen 4-12 µg/l liegt. Bei der Erhaltungstherapie wird der Talspiegel auf 12-20 µg/l angehoben, da meist gleichzeitig das CSA reduziert oder abgesetzt wird [50, 52].

Ein ähnliches Vorgehen wählt man bei EVE. Man beginnt die Therapie mit einer Initialdosis von 0,75-1,5 mg zweimal täglich und einem Zielspiegel von 3-8 µg/l. Auch EVE wird in der Regel in Kombination mit CSA und Glukokortikoiden eingesetzt. Die Erhaltungstherapie erfolgt durch Beibehalten des EVE-Spiegels über 3 µg/l und Reduktion des CSA [7].

2. Zielsetzung

Ziel meiner Untersuchung ist die Etablierung der LC-MS/MS-Methodik für die Bestimmung der Blutspiegel der Immunsuppressiva CSA, TAC, SIR und EVE am Universitätsklinikum Düsseldorf. Der Ergebnisvergleich mit den bisher für diese Analysen eingesetzten Immunoassays und die Bewertung der neuen Methodik hinsichtlich Messqualität, Prozessorganisation, Ökonomie und möglichen Auswirkung auf die Patientenversorgung werden weitere Aspekte dieser Studie sein.

Die zu prüfende Hypothese lautet, dass eine Immunsuppressiva-Spiegelmessung mit einer LC-MS/MS sowohl weniger störanfällig ist als auch genauere Ergebnisse, im Vergleich zu den aktuell schon etablierten Immunoassays, liefert. Außerdem wird erhofft, dass die LC-MS/MS kostengünstiger ist und dabei eine gleichwertige Testverfügbarkeit liefert. Eine Schwäche der LC-MS/MS könnte jedoch eine erhöhte Zeit bis zur Befundfreigabe (*turn-around-Zeit*) sein. Deshalb ist festzustellen, ob die Ergebnisverfügbarkeit bei Einsatz der LC-MS/MS den klinischen Anforderungen gerecht wird.

Die genaueren Ergebnisse kann vermutlich die LC-MS/MS liefern, weil sie Metaboliten der Immunsuppressiva im Blut nicht mitbestimmt, was bei den Immunoassays der Fall ist. Da die Metaboliten inaktiv sein können, verfälschen sie aktuell das Ergebnis der Spiegel im Blut, was von den behandelnden Ärzten mit einkalkuliert werden muss [53]. Die Anschaffung einer LC-MS/MS ist sehr kostspielig. Andererseits sind die Kosten pro Einzelmessung geringer. Bei den Immunoassays verhält es sich umgekehrt. Es ist deshalb zum jetzigen Zeitpunkt unklar, ob der Qualitätszuwachs durch Umstellung auf LC-MS/MS-Methodik zu einer Kostensenkung oder -steigerung führen wird und bei welcher Analysenzahl und zu welchem Zeitpunkt der Punkt, an dem die LC-MS/MS kostengünstiger ist, erreicht werden kann. Diese Zusammenhänge zu erfassen und zu analysieren ist ein weiteres Ziel des Projekts.

Je nach Ergebnissen der Messungen ist eine enge Kommunikation mit den behandelnden Ärzten nötig, da es sich um eine neue Methodik handelt und dementsprechend andere Spiegel der Immunsuppressiva zu erwarten sind.

Die Evaluierung wird mittels vier Arbeitsschritten vollzogen. Diese sind die Serienpräzision, die Tag-zu-Tag-Präzision, der Patientenvergleich und die Linearität, die allesamt die Stabilität, Kontinuität und Robustheit der Ergebnisse der LC-MS/MS zeigen sollen. Weitere Schritte des Methodenvergleichs dieser Studie sollen die klinische Wertigkeit für Patienten und Arzt veranschaulichen.

3. Material und Methoden

3.1. LC-MS/MS

3.1.1. Allgemeines

Man kann die LC-MS/MS in die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und MS/MS unterteilen. Diese zwei unabhängig voneinander funktionierenden analytischen Systeme, werden über Pumpen miteinander verbunden. Zunächst werden die zu messenden Bestandteile vom flüssigkeitschromatischen System von Verunreinigungen der Blutprobe abgetrennt, danach von einer Ionenquelle ionisiert, um anschließend in der MS stoffspezifisch quantifiziert werden zu können [2, 54].

Vier Arbeitsschritte sind bei der Untersuchung der Immunsuppressiva-Spiegel mittels LC-MS/MS nötig. Erstens die Blutentnahme von den Patienten im geregelten Routineablauf. Zweitens die Aufarbeitung der Proben mit Hilfe des Pipettierroboters. Als drittes folgt die Auftrennung der Proben in ihre verschiedenen Bestandteile in der HPLC und als letztes die quantitative Messung der gewünschten Bestandteile durch die MS/MS.

3.1.2. Blutabnahme und Patientenkollektiv

Die Blutentnahmen für die Messungen dieser Studie wurden über die Routineuntersuchungen geregelt. Die Patienten waren organtransplantiert und bekamen zur Immunsuppression eines oder mehrere der Immunsuppressiva CSA, TAC, SIR oder EVE in Kombination mit anderen Immunmodulatoren. Die Spiegel von CSA und TAC wurden bisher im eigenen Labor mittels der Immunoassays gemessen, während die von EVE und SIR durch das Labor Limbach (Heidelberg) mit einer LC-MS/MS ermittelt worden sind.

Gemessen wurden die Talspiegel der Immunsuppressiva. Die Blutentnahme für die Messung wurde folglich direkt vor der nächsten Einnahme des Medikaments durchgeführt. Unmittelbar nach der Transplantation eines Herzens am Universitätsklinikum Düsseldorf wird der TAC-Spiegel täglich kontrolliert. Bei komplikationslosem Verlauf werden die Spiegel nach Entlassung und Rehabilitation alle 4-6 Wochen kontrolliert.

Für die Blutentnahmen zur Messung mit den Immunoassays wurden Vollblut Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen benötigt. Die Proben sind bei +2 bis +8°C bis zu 7 Tage haltbar [51], bei längerer Lagerung sollten die Proben bei mindestens -18°C

gelagert werden [55]. Das nach allen Messungen in den EDTA-Röhrchen übrig gebliebene Blut (*Left-Overs*) wurde für die Evaluierung der LC-MS/MS verwendet.

3.1.3. Pipettierroboter

Die Reste aus den Blutentnahmen wurden nun dem Pipettierroboter *MassSTAR*® der Firma *Hamilton (Hamilton Bonaduz AG)* für die automatische Probenvorbereitung zugeleitet. Bei Probenrestvolumen von weniger als 450 µl wird die Probe vom Pipettierroboter nicht erkannt und es muss eine manuelle Probenvorbereitung erfolgen. Zunächst werden die Proben im Roboter homogenisiert und 50 µl Vollblut, Kontrolle oder Kalibrator in eine *96-Deep-Well-Filterplatte* eingebracht. Die Filterplatte ist eine Mikrotiterplatte, die speziell für Probenverarbeitung mit hohem Durchsatz verwendet wird. Nun werden zu den Proben 25 µl *Internal Standard* gegeben. Als nächstes wird vom Roboter 100 µl *Extraction Buffer* hinzugefügt. Durch diesen werden die Moleküle im Blut stabilisiert, was dessen Isolierung erleichtert. Danach werden die Proben bei 1200 U/min. für zwei Minuten geschüttelt. 250 µl *Precipitation Reagent* wird daraufhin mit den Proben vermischt, um diese danach noch einmal bei 1200 U/min. für drei Minuten zu schütteln. Das Reagens gewährleistet die Stabilität des internen Standards und weitere Proteine werden ausgefällt. Durch die Zentrifugation, die zweieinhalb Minuten dauert, wird der Niederschlag, der durch die ausgefällten Proteine entsteht, abgetrennt [55]. Diese Probenvorbereitung dient der Entfernung von interferierenden Proteinen und der Zugabe eines internen Standards und Kontrollproben [56]. Durch den internen Standard kann man Fehler bei der Vorbereitung oder Messung der Proben kontrollieren. Der Messwert muss in jeder Probe gleich hoch sein. Proben mit deutlich abweichenden internen Standards müssen erneut gemessen werden. Über den internen Standard können auch Matrixeffekte aufgedeckt bzw. ausgeschlossen werden. Der interne Standard hat dieselben chemischen Eigenschaften wie der Analyt und unterscheidet sich von diesem nur durch kleine Abweichung der Masse [57]. So ist im eigenen Vorgehen für Messungen mit CSA der interne Standard CSA d12 verwendet worden. Dieser hat an 12 Stellen ein Deuterium statt eines einfachen Wasserstoffs gebunden und ist daher um circa 12 g/mol schwerer als CSA. Da die Wahrscheinlichkeit, dass ein CSA-Molekül ein Deuterium natürlicherweise gebunden hat deutlich unter einem Prozent liegt, wird nahezu kein CSA d12 aus der Patientenprobe stammen, sodass dieses Molekül einen optimalen internen Standard darstellt. Die übrigen internen Standards sind TAC¹³Cd₂, SIRd₃ und EVED₄.

3.1.4. HPLC

Die HPLC trennt ein flüssiges Gemisch in seine Bestandteile auf und kann diese quantitativ bestimmen. Im Gegensatz zur Gaschromatographie lassen sich mit der HPLC auch thermisch labile Stoffe untersuchen [58]. In diesem Verfahren wird sie präparativ verwendet, also der MS vorgeschaltet. Im Allgemeinen besteht die HPLC aus vier verschiedenen Komponenten. Der Pumpe, dem Probenaufgabesystem, der Säule und dem Detektor [59]. Abbildung 5 zeigt eine vereinfachte Darstellung einer HPLC. Die Pumpe gibt die zu verwendenden Lösungsmittel zusammen. Der Probengeber fügt nun eine bestimmte Menge an Probe hinzu. Diese Mischung wird anschließend zur HPLC-Trennsäule transportiert, um das Gemisch in seine einzelnen Komponenten aufzutrennen.

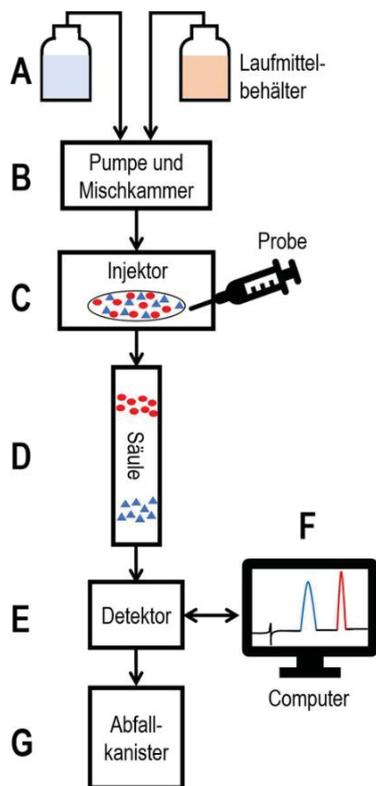


Abbildung 5: Aufbau einer HPLC; Laufmittel und Probe werden über Pumpen zur Trennsäule transportiert, dort aufgetrennt und anschließend über einen Detektor gemessen

(<http://www.mpl.loesungsfabrik.de/blog/hplc/hplc-anlage-einfach-erklart>, Mit freundlicher Genehmigung der Lösungsfabrik [62])

Die Auftrennung wird durch die sehr feinkörnigen Partikel in der Säule, durch die die verschiedenen Bestandteile des Gemischs durchwandern müssen, veranlasst [60]. Oftmals werden Vorsäulen vor die eigentliche analytische Trennsäule geschaltet, um eine Verschmutzung durch große Partikel zu vermeiden [61]. Der Detektor kann z.B. nun mittels von einer Lampe ausgestrahltes UV-Licht messen. Das UV-Licht wird je nach Komponente, welche gerade durch den Detektor fließt, mehr oder weniger absorbiert, wodurch verschiedene *Peaks* auf dem Computer angezeigt werden. Die Messung und Übertragung an den Computer entfallen jedoch bei Kopplung an eine MS, da hier die MS den Detektor enthält [60, 61].

Für die Messung gibt man die im Pipettierroboter vorbereiteten Überstände der Proben in die Probenkammer der HPLC. Die HPLC des Universitätsklinikums Düsseldorf ist von dem Hersteller *Shimadzu* und ist eine *Nexera XR LC-20AD_{XR}*. Die mobile Phase A und mobile Phase B

des LC-MS/MS Reagenzienkit werden mit einer Laufzeit von 2 ml/min. und 0,6 ml/min. durch die Pumpe A und Pumpe B gefördert. Dabei werden die zwei Laufmittel über die Pumpen entweder zur Vorsäule oder zur analytischen Säule geleitet. Der Säulenofen, der

die Verankerung der Säulen in der HPLC darstellt, sollte für die Vorsäule Raumtemperatur und für die analytische Säule 65°C betragen. Die zwei Säulen müssen vor Inbetriebnahme äquilibriert worden sein. Es gibt zwei Säulenschaltungen. Auf der Ventilstellung „*Trap*“ wird die Probe zur Vorsäule geführt. Danach schaltet das Gerät um auf „*MS/MS*“ und die vorgefilterte Probe wird zur analytischen Säule und von dort zum Detektor transportiert [55]. Ein konstanter Druck, um die 125 bzw. 210 mmHg für Pumpe A und um die 55 bzw. 33 mmHg für die Pumpe B, je nach aktueller Ventileinstellung, sollte erreicht werden. Schwankt der Druck muss das System auf Leckagen, Verstopfungen oder andere Problematiken des generellen Aufbaus überprüft werden. Für den Injektor wird die Nadelspülflüssigkeit *Rinsing Solution*, ebenfalls aus dem Reagenzienkit, benötigt. Die Spülung läuft automatisch über die Pumpe C.

3.1.5. MS/MS

Die MS ist ein analytisches System, das der Bestimmung der Masse und Häufigkeit von Molekülen dient. Um massenspektrometrisch registriert werden zu können, müssen die Moleküle ionisiert werden, denn die MS zeichnet als Ergebnis das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) auf [63].

Nach der Präanalytik durch die HPLC wird die Probe automatisch weitergegeben. Die Kopplung der HPLC mit der MS gelang durch die „Entwicklung spezieller Ionenquellen [...], die das von der HPLC stammende Lösungsmittel entfernen und den Analyten in die für das Massenspektrometer notwendige Gasphase überführen“ [54] konnten. Im Fall dieser MS/MS, oder auch Tandem-MS, werden die Substanzen der Probe durch eine ESI, ionisiert und in Aerosole überführt. Die Probe wird dafür verdünnt und in eine Sprühkapillare geleitet. Nun wird eine Spannung an die Kapillare angelegt, sodass an dessen Ende keine konvexe Oberflächenspannung entsteht, sondern der sogenannte Taylor-Konus. Im Anschluss wird der Punkt erreicht, an dem die Oberflächenspannung überwunden wird und sich kleinste Partikel lösen. Es entsteht ein Strahl aus Aerosolen, welche stark ionisiert sind (siehe auch Abbildung 6). Wie genau aus den größeren Tropfen der Kapillare die Ionen entstehen ist jedoch noch Gegenstand der Forschung [63].

Nun werden diese Aerosole über ein Verbindungsstück in das Massenspektrometer geführt. Nur ionisierte Partikel werden angesaugt und können ihre Flugbahn so drehen, dass sie in den Analysator gelangen. Da der Analysator selbst ein Vakuum besitzt, hat dieses Verbindungsstück außerdem die Aufgabe den Aerosol-Strom, bei Überführung vom Atmosphärendruck ins Vakuum, aufrecht zu erhalten [56, 63].

Die Ionisation selbst geschieht unter Atmosphärendruck. Eine weitere Variante der Ionisation unter Atmosphärendruck ist die *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) [64].

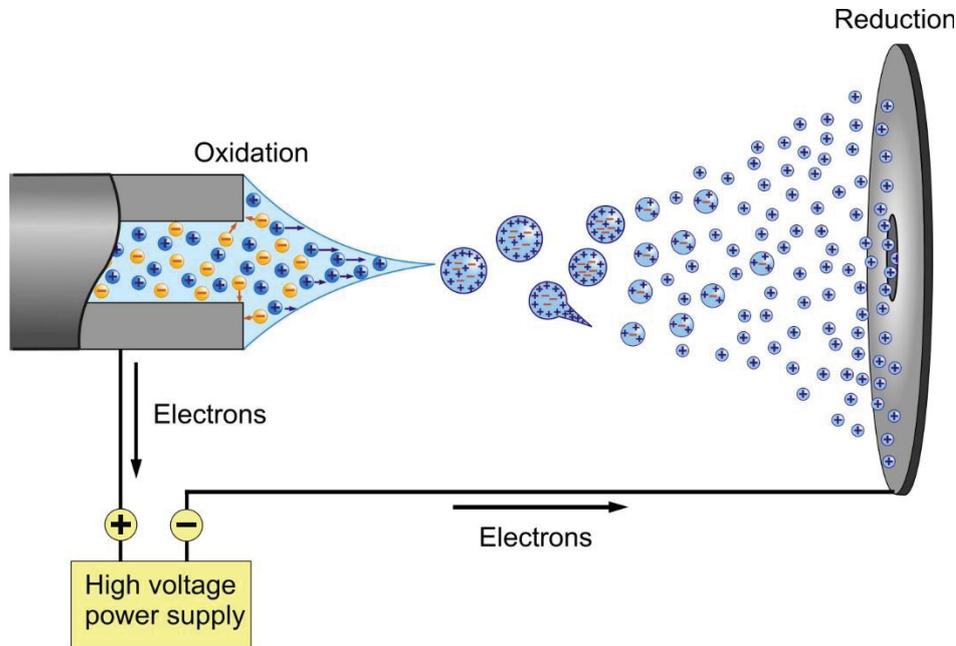


Abbildung 6: Schematischer Aufbau einer ESI; durch Anlegen einer Spannung entsteht der Taylor-Konus, von dem sich kleinste Partikel lösen und zu einem Aerosol-Strom werden, der über ein Verbindungsstück in die MS geleitet wird.

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ESI_positive_mode_\(21589986840\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ESI_positive_mode_(21589986840).jpg), dieses Bild wurde ursprünglich veröffentlicht von Flickr auf Visualize Your Science at <https://flickr.com/photos/136533650@N02/21589986840> (archive). Es wurde überprüft am 17 September 2018 von FlickrviewR 2 und wurde bestätigt, um unter den Bedingungen von cc-by-2.0 lizenziert zu werden [65])

15

Der Analysator setzt sich aus drei hintereinander geschalteten Quadrupolen zusammen [49]. Ein Quadrupol besteht aus vier parallel ausgerichteten Metallstäben, die positiv oder negativ geladen werden können. Die ankommenden Ionen werden von den Stäben angezogen oder abgestoßen, sodass nur durch sehr schnell wechselnde Umpolung der

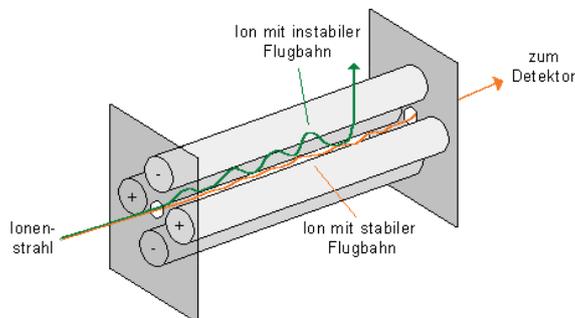


Abbildung 7: Skizze eines Quadrupols mit Ionenstrahl und zwei verschiedenen Flugbahnen der Ionen (instabil und stabil)

(http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_quadrupol.html, mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags [67])

Stäbe eine stabile Flugbahn durch den Quadrupol möglich ist [66]. Abbildung 7 zeigt diesen Vorgang in vereinfachter Darstellung.

Im Tandem-MS, oder auch MS/MS, werden die nach dem ersten Quadrupol nach Ladung selektierten Ionen, im zweiten Quadrupol fragmentiert. Durch diese Fragmentierung erhält man Vorläufer-Ionen, die sehr spezifisch für

das jeweilige Ion sind [64]. Der Vorgang nennt sich auch Massenübergang der Analyte [63]. Die Fragmentierung wird in dieser Studie durch stickstoffinduzierte Kollisionen und darauffolgende Dissoziationen verursacht. Dafür wird der Stickstoff aus der Luft gefiltert und über einen Tank in den Analysator gepumpt. Der dritte Quadrupol selektiert die Vorläufer-Ionen wieder nach m/z , damit idealerweise am Ende nur die zu bestimmenden Vorläufer-Ionen zum Detektor gelangen können. Diese Art der Trennung von Ionen nach Masse wird auch *multiple reaction monitoring* (MRM) [46] genannt (siehe Abbildung 8).

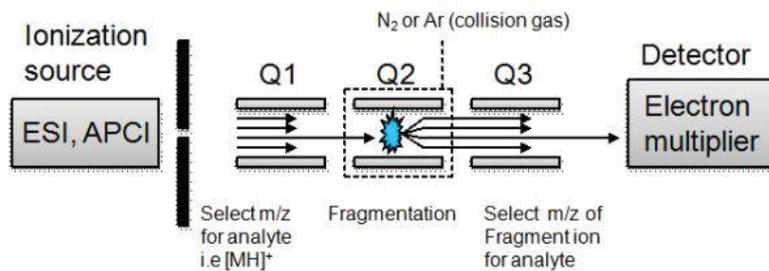


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Tandem-MS; die von der ESI ionisierten Moleküle gelangen in den ersten Quadrupol, werden dort nach m/z selektiert, dann im zweiten Quadrupol fragmentiert, um im dritten Quadrupol erneut selektiert und danach im Detektor gemessen zu werden

(<https://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/microdosing-assessment-to-evaluate-pharmacokinetics-and-drug-metabolism-using-lc-mc-ms-technology> oder [56] mit freundlicher Genehmigung von Ivan Šuljić: © 2012 Ni J, Rowe J. Published in „Topics on drug metabolism“ (Paxton) under CC BY 3.0 license. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/28525>)

Die Vorläufer-Ionen werden im Detektor gemessen und man erhält die für die MS/MS typischen Chromatogramme, bei der die Peaks der Immunsuppressiva oder internen Standards auf die Zeit aufgetragen sind. Damit werden die genauen Konzentrationen der Medikamente im Blut ermittelt. Diese Ergebnisse einzuordnen ist Aufgabe der Statistik. Die in dieser Studie verwendete LC-MS/MS ist die *QTRAP® 4500/TripleQuad™ 4500 LC-MS/MS* von der Firma *SCIEX (AB Sciex GmbH Germany, Darmstadt)* und getestet wird das LC-MS/MS Reagenzienkit *MassTox®* von *Chromsystems (Chromsystems Instruments and Chemicals GmbH, München, Deutschland)* mittels automatisierter Probenvorbereitung. Das Reagenzienkit enthält alle für die Messung der Immunsuppressiva benötigten Substanzen. Die Kontrollen, Kalibratoren und internen Standards sind bei einer kurzen Lagerung von bis zu 7 Tagen (bzw. 14 Tagen bei den internen Standards) bei +2°C bis +8°C zu lagern, bei längerer Lagerung sollte die Temperatur unter -18°C liegen. Länger als drei Monate sollten die Reagenzien nicht aufbewahrt werden.

Vor Inbetriebnahme des Systems findet ein Gerätetuning zur Optimierung der Übergänge und eine Kalibrierung statt. Die Kalibratoren werden zudem auch jeden Tag während des

ersten Messdurchgangs mitgeführt. Dies gewährleistet, dass die genauen Lagen der Signalmaxima erfasst und die Messungen genauer werden. Zudem sollten die Vakuumpumpen schon mindestens acht Stunden in Betrieb und das System vor der Messung equilibriert sein. Die Signalintensitäten sind mehrfach mit Kontrollen von Chromsystems zu überprüfen. Die vier Kontrollen werden bei jeder Messung mitgeführt [55]. Für die Kalibrierung wurde hier das *6Plus1® Multilevel Whole Blood Calibrator Set* und für die Kontrollen *die MassCheck® Immunosuppressants Whole Blood Control Four Level 1-4* und *Blank Control* verwendet.

Die Analysedauer nach der Probenvorbereitung ist abhängig vom verwendeten Massenspektrometer und beträgt bei dem in dieser Studie verwendeten Gerät circa zwei Minuten.

Der lineare Messbereich der LC-MS/MS liegt laut Validationsdaten von *Chromsystems* zwischen 0,5-100 µg/l für TAC, SIR und EVE und zwischen 6-2000 µg/l für CSA. Die Wiederfindungsrate liegt für CSA bei 98%, für TAC bei 93%, für SIR bei 104% und für EVE bei 100% [55].

Für die Massen und Massenübergänge der Analyte und internen Standards in der MS/MS-Fragmentierung wurde im eigenen Vorgehen von den in Tabelle 2 angegebenen Werten ausgegangen. Die angegebenen Massen sind jedoch nur als Ausgangspunkte zu verstehen, da die Lage des Signalmaximums je nach MS-System variieren kann.

Die zweiten Massenübergänge (siehe Tabelle 3) sind dafür da, die verschiedenen Massenübergänge miteinander in Verhältnis setzen zu können. Damit kann man die Messungen zusätzlich auf ihre Richtigkeit kontrollieren, eine Störung muss aber nicht zu einem Ausschluss der Probe führen. Die Werte sind nicht validiert.

Tabelle 2: Massen und Massenübergänge der Immunsuppressiva

Substanz	Summenformel	Exakte Masse in g/mol	Massenübergang 1 in g/mol
CSA	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	1201,8	1219,9 → 1202,8
CSA d12	$C_{62}H_{99}D_{12}N_{11}O_{12}$	1213,9	1231,9 → 1214,8
TAC	$C_{44}H_{69}NO_{12}$	803,5	821,5 → 768,6
TAC ¹³ Cd2	$C_{43}^{13}CH_{67}D_2NO_{12}$	806,5	824,5 → 771,6
SIR	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	913,6	931,6 → 864,5
SIR d3	$C_{51}H_{76}NO_{13}D_3$	916,6	934,6 → 864,5
EVE	$C_{53}H_{79}NO_{14}$	957,6	975,6 → 908,5
EVE d4	$C_{53}H_{79}D_4NO_{14}$	961,6	969,6 → 912,5

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[55])

Tabelle 3: Massenübergänge 2 für die weitere Kontrolle der Messungen

Substanz	Massenübergang 2 in g/mol
CSA	1219,9 → 675,5
TAC	821,5 → 786,6
SIR	931,6 → 882,5
EVE	975,6 → 926,5

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[55])

18

3.1.6. Normwerte

Im Folgenden finden sich in Tabelle 4-7 die Referenzwerte für die Immunsuppressiva-Spiegel bei Messungen mit der LC-MS/MS des Zentrallabors der Universitätsklinik Düsseldorf.

Table 4: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für CSA zu Beginn und zur Erhaltungstherapie

CSA	Initiale Therapie in µg/l	Erhaltungstherapie in µg/l
Nierentransplantation	150-225	100-150
Lebertransplantation	225-300	100-150
Herztransplantation	250-350	150-250
Knochenmark-transplantation	200-300	150-200

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[51, 55, 68])

Table 5: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für TAC zu Beginn und zur Erhaltungstherapie

TAC	Initiale Therapie in µg/l	Erhaltungstherapie in µg/l
Nierentransplantation	9-13	4-9
Lebertransplantation	9-13	4-9
Herztransplantation	9-15	7-13
Stammzelltransplantation	4-10,5	4-10,5

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur [51, 55, 68])

Table 6: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für SIR

SIR	Referenzbereich in µg/l
Nierentransplantation mit Triple-Therapie (CSA, Glukokortikoiden, SIR)	4-12
Nierentransplantation mit Glukokortikoiden und SIR	12-20
Lebertransplantation mit CSA/TAC und ggf. Glukokortikoide	3-6
Lebertransplantation mit SIR und ggf. Glukokortikoiden	5-8

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[51, 55, 68])

Tabelle 7: Minimaler Bereich der Blutkonzentration für EVE

EVE	Minimum in µg/l
Transplantation mit Triple-Therapie (CSA, Glukokortikoiden und EVE)	3-8

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung folgender Literatur:[51, 55, 68])

Für EVE sind bisher ebenfalls ein Zielspiegel von 3-8 µg/l in der Befundübermittlung des Fremdlabors angegeben, für SIR ist dieser abhängig von der Art der Therapie und Transplantation. Bei einer Nierentransplantation-Triple-Therapie wurde ein Talspiegel von 4-12 µl empfohlen, bei Dual-Therapie 12-20 µl und nach einer Lebertransplantation 3-8 µl und sollte eine Grenze von 12 µl nicht überschritten werden¹. In etwa stimmen diese Normwerte mit den Werten für das Zentrallabor des UKDs überein.

3.2. ECLIA-Immunoassay

3.2.1. Allgemeines

20

Die ECLIA Immunoassays *Elecsys Cyclosporine*® und *Elecsys Tacrolimus*® für den Einsatz auf der Plattform *cobas 8000*® der Firma *Roche Diagnostics (Roche Deutschland Holding GmbH)* waren die verwendeten analytischen Verfahren für die Messung der TAC- und CSA-Spiegel am Universitätsklinikum Düsseldorf. Es handelte sich in diesem Fall um Sandwich-Immunoassays [42].

Da TAC und CSA im Vollblut zum Großteil an Proteine und Erythrozyten gebunden sind, war auch bei diesem Verfahren eine Probenvorbereitung notwendig [69, 70]. Während der manuellen Vollblutprobenvorbereitung wurden mittels eines Vorbereitungsreagenz die zu untersuchenden Immunsuppressiva in sieben Schritten von der Matrix gelöst. Als erstes mussten alle Proben, Reagenzien, Kalibratoren und Kontrollen zwischen 20 – 25 °C gebracht und sorgfältig gemischt werden. Danach wurden 300 µl der zu messenden Substanz in je ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und nach Inhalt beschriftet. Hiernach wurden 300 µl *ISD Sample Pretreatment* in jedes Zentrifugenröhrchen gegeben und diese schnell verschlossen. Folgend wurden die Röhrchen mindestens 10 Sekunden im Vortex-Mixer gemischt und anschließend vier Minuten bei 10900 U/min zentrifugiert.

¹ (vgl. https://lv.limbachgruppe.com/onlinelvz/11_de#/detailView/46810 und https://lv.limbachgruppe.com/onlinelvz/11_de#/detailView/47587) mit freundlicher Genehmigung von Jonas Brand

Als letztes wurde der dabei entstandene Überstand in ein für die Messung geeignetes Gefäß gefüllt. Wegen der Verdunstungseffekte sollten die vorbehandelten Proben innerhalb von 30 Minuten durch den Immunoassay verarbeitet werden [71, 72].

Es folgten die drei Schritte des Immunoassays. Vor Verwendung musste das Gerät kalibriert werden. Außerdem lief bei jeder Messung eine Kontrolle mit. Diese musste innerhalb des Referenzbereiches liegen damit die Laborwerte freigegeben werden konnten. Zunächst wurden zu 35 µl der TAC- oder 20 µl der CSA-Patientenprobe ein mit Biotin gebundener Antikörper und ein an Ruthenium gebundenes TAC/CSA-Derivat hinzugegeben und das Gemisch anschließend inkubiert. Nach neun Minuten hatte der Antikörper nun entweder an das echte TAC/CSA oder an dessen Derivat gebunden. Im zweiten Schritt wurden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel (0,72 mg/ml) dem Gemisch zugefügt und erneut inkubiert. Innerhalb von neun Minuten hatten die Mikropartikel an den biotinylierten Antikörper gebunden. Im letzten Schritt wurde das Gemisch auf eine Messzelle aufgebracht und über magnetische Wechselwirkungen fixiert. Danach wurden ungebundene Substanzen mittels der Substanz *ProCell* von der Messzelle entfernt. Die Chemilumineszenzemission wurde sodann durch Anlegen einer Spannung erreicht. Das so entstandene Licht konnte von einem Detektor gemessen werden. Je stärker das Signal war, welches den Detektor erreichte, desto höher war auch die Konzentration des Immunsuppressivums im Gemisch [69, 70].

21

Nach Aufarbeitung des Blutes dauerte der Test insgesamt circa 18 Minuten pro Durchgang. Der Messbereich lag zwischen 0,50-40,00 ng/ml für TAC und zwischen 30-2000 ng/ml für CSA. Die Erfassungsgrenzen lagen jeweils etwas niedriger. Bei Konzentrationen oberhalb des Messbereichs konnten manuell Verdünnungen von 1:3 mittels *Diluent Universal* vorgenommen werden [69, 70]. Eine Messzelle war ausreichend für die gleichzeitige Bearbeitung von 35 Proben. Jedoch sollte die Probenanzahl 20 nicht überschreiten, da ansonsten die zuerst vorbereiteten Proben zu lange vor der Weiterverarbeitung stehen blieben (s.o.).

Zur internen Qualitätskontrolle wurden für den Variationskoeffizienten (CV für engl. *Coefficient of variation*) und die Unrichtigkeit maximal 8% Abweichung zugelassen. Für den Chargenvergleich mit Patientenproben war jedoch eine Abweichung der Einzelwerte von bis zu 11,2% zugelassen [69-72].

3.2.2. Normwerte

Man erwartet andere Normwerte für die Ergebnisse der Immunoassays als für die Ergebnisse der LC-MS/MS, da die Immunoassays auch Abbauprodukte der Immunsuppressiva TAC und CSA mitbestimmen und somit höher liegen sollten [53]. Trotzdem wurden am UKD für die Immunoassays für CSA exakt dieselben Referenzbereiche verwendet wie jetzt für die LC-MS/MS [72]. Auch die Referenzwerte für TAC sind den Werten sehr ähnlich. Nur die Zielbereiche für die Initialtherapie nach Leber- (10-20 µg/l) und Herztransplantation (15-20 µg/l) sind höher angesetzt. Dafür ist jedoch der Wert zur Erhaltungstherapie nach Herztransplantation sogar niedriger festgelegt (5-10 µg/l) [71].

3.3. Methodik der Evaluierung

Die Evaluierung des Kits der LC-MS/MS wurde mittels vier Schritten vollzogen. Diese sind die Serienpräzision, die Tag-zu-Tag-Präzision, der Patientenvergleich und die Linearität, die allesamt die Stabilität, Kontinuität und Robustheit der Ergebnisse der LC-MS/MS zeigen sollten.

Für die Serienpräzision wurde dieselbe Probe mindestens 20-mal an einem Tag mit der LC-MS/MS gemessen. Eine gute Serienpräzision wurde angenommen, wenn die Ergebnisse dieser Messungen nicht mehr als 9% vom berechneten Mittelwert (MW) abwichen. Die Verifizierungsdaten des Herstellers zeigen CVs von 2,7-9,5% auf [55], sodass für das Zentrallabor die eben genannte Grenze bestimmt worden ist. Die Serienpräzision wurde mit drei verschiedenen Proben, mit Spiegel im hohen, mittleren und unteren Bereich, durchgeführt. Zwei der Proben waren aus Vollblut, in dem anfangs keines der Immunsuppressiva enthalten war. Zu diesem wurde eine Konzentration an allen vier Immunsuppressiva gegeben, um eine hohe und eine tiefe Kontrolle zu erhalten. Die dritte Probe war eine Mischung aus Patientenproben, in denen CSA und TAC therapiebedingt bereits vorhanden waren und SIR und EVE in definierten Mengen zugesetzt wurden (Patienten-Pool 1).

Mittels der Tag-zu-Tag-Präzision sollte überprüft werden, ob die LC-MS/MS-Bestimmung an mindestens 20 verschiedenen Tagen für ein und dieselbe Probe immer wieder den gleichen Wert ergibt. Die Messungen an Vormittag und Nachmittag desselben Tages wurden dabei als zwei verschiedene Tage gewertet, da es sich hier um unabhängige Analyseserien handelte. Auch hier wurde eine Abweichung von 9% als Zielwert an

Anlehnung an die Herstellerangaben festgesetzt. Um alle möglichen Messbereiche abzudecken, wurden fünf Proben verwendet. Vier Kontrollen und der Patienten-Pool 1. Beim Patientenvergleich wurden die routinemäßig mit den Immunoassays bestimmten Werte für CSA und TAC mit den korrespondierenden Werten der LC-MS/MS verglichen. Für EVE und SIR wurden die vom Fremdlabor reportierten Messwerte den eigenen LC-MS/MS-Messungen gegenübergestellt. Für TAC gab es für alle Wertebereiche genügend Patientenproben, für CSA mussten unbestimmte Mengen an gelöster Reinsubstanz CSA zu Proben hinzugegeben werden, um höhere Werte zu erreichen. SIR- und EVE-Proben wurden bisher in externen Auftragslaboratorien bestimmt. Vor dem Fremdversand wurden für die Vergleichsmessung mit der laboreigenen LC-MS/MS des Zentrallabors des UKDs kleine Mengen der Blutprobe zurückgestellt. Die aus den Rückstellproben eigens gemessenen Werte wurden mit den aus dem Auftragslabor berichteten Werten verglichen. Aufgrund der seltenen klinischen Anwendung konnte der Patientenvergleich für SIR nur an wenigen Proben durchgeführt werden. Um zumindest eine für die Statistik ausreichende Menge SIR gegenmessen zu können, wurde mit dem Fremdlabor ein Methodenvergleich arrangiert. So konnten 30 weitere SIR-Proben gewonnen werden. Außerdem wurden für CSA und SIR auch Proben eines erfolgten Ringversuchs eingesetzt. Durch diese Vergleiche wurde eine Probenanzahl von 103 für CSA, 152 für TAC, 34 für SIR und 98 für EVE erreicht.

23

Ein Vergleich von LC-MS/MS und LC-MS/MS des Fremdlabors für CSA und TAC erschien im Verlauf sinnvoll, sodass noch eine kleine Versuchsreihe von jeweils 19 Proben für beide Immunsuppressiva im Zentrallabor des UKDs gemessen und danach zum Fremdlabor zum Gegenmessen geschickt wurden. Der Patientenvergleich umfasst somit den Vergleich der LC-MS/MS mit den Immunoassays für CSA und TAC und den Vergleich von LC-MS/MS des Zentrallabors mit der LC-MS/MS des Fremdlabors für alle Immunsuppressiva.

Im letzten Schritt der Evaluierung, wurde überprüft, ob Messwerte über den gesamten relevanten Messbereich hinweg mit der tatsächlichen Analytkonzentration linear korrelierten. Zur Überprüfung der Linearität wurde der dritte Patienten-Pool hergestellt (Patienten-Pool 3). Dafür erhielten 10 ml EDTA-Vollblut Reinslösungen aller Immunsuppressiva pipettiert, sodass das Gemisch nun für alle im weit oberen therapeutischen Bereich lag. Der Patienten-Pool 3 wurde viermal hintereinander gemessen, um aus diesen Messungen einen Zielwert zu ermitteln. Nach der Ermittlung des Zielwertes konnten aus diesem Pool 11 Proben, Level 1-11, erstellt werden. Level 11

stellte dabei die Probe gemäß dem Zielwert dar. Alle weiteren Level wurden seriell so verdünnt, dass sie rechnerisch jeweils 10% weniger Zielsubstanz als das höhere Level aufwiesen. Level 1 war eine 50:50 Verdünnung des Levels 2, um auch die sehr niedrigen Bereiche der Immunsuppressiva-Spiegel abzudecken. Verdünnt wurde bei allen Leveln mit demselben EDTA-Vollblut, mit dem auch der Patienten-Pool 3 hergestellt worden war. Die berechneten Konzentrationen wurden mit den tatsächlich erhaltenen Messergebnissen verglichen. Die Verdünnungsreihen wurden doppelt gemessen, um die Stabilität der Linearität und Ausreißer oder Verschiebungen erkennen zu können.

3.4. Methodik des Methodenvergleichs

Der Methodenvergleich verglich die LC-MS/MS mit den Immunoassays in den wichtigsten klinischen, laborchemischen und personalbezogenen Punkten. Darunter fiel ein Teil des Patientenvergleichs und eine Beobachtung zwei bestimmter, frisch transplantiertes, Patienten. Die Messungen der Immunsuppressiva-Spiegel mit den Immunoassays wurden für diese Patienten täglich mit denen der LC-MS/MS verglichen und in einen klinischen Kontext gesetzt, z.B. in Hinsicht auf die Frage, ob man mit den Werten der LC-MS/MS die Therapie des Patienten anders gestaltet bzw. optimiert hätte. Im Weiteren wird dies als Patientenverfolgung bezeichnet. Außerdem erfolgte die Analytik des Zeitmanagements mit Hilfe der Probenlaufzeitmarken, die im Laborinformationssystem aus dem Routinebetrieb der beiden Methoden verfügbar sind, den Erfahrungen nach Einsicht und Praktizierung der Methoden und anhand von Personalbindungsminuten (*hands-on-Zeit*). Die *turn-around-Zeiten* wurden mittels der Probelaufzeitmarken vom 01.02.2020-31.03.2020 und 01.02.2021-31.03.2021 berechnet. 2020 wurden die Immunoassays und der Fremdversand und 2021 die LC-MS/MS verwendet. Es wurde die Differenz zwischen Ankunft im Labor und technischer Freigabe berechnet. Zeiten unter 20 Minuten sind mit keiner Methode zu erzielen und wurden als unplausibel ausgeschlossen.

Bei der Ermittlung der *hands-on-Zeit* wurden die Mitarbeiter angewiesen während des gesamten Vorganges die vier Zeiten zu messen an denen an der LC-MS/MS ein Mitarbeiter anwesend sein oder eine Tätigkeit verrichten musste. Diese waren die Vorbereitung des Pipettierroboters, die Bestückung, die Vorbereitung und der Start der MS und die Auswertung und Übertragung der Ergebnisse. Insgesamt wurden 39 Durchgänge im Zeitraum von Februar bis Mai 2021 ausgewertet.

Die Wirtschaftlichkeit wurde mittels vorliegender Lieferverträge, Anschaffungspreisen und Abrechnungen bei Preis pro Befund berechnet.

3.5. Statistik

Die Messungen wurden über das *SCIEX*-Software-System *Analyst*® *MD* quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mittels Excel, eines Evaluationsprotokolls auf Basis von „MS-Excel“ und „R“ [73] statistisch ausgewertet. Das Grundgerüst des Evaluationsprotokolls stellte freundlicherweise die IT des Zentralinstituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik zur Verfügung. Durch dieses Protokoll konnten für die Präzisionen je nach Sinnhaftigkeit das Minimum (Min.), der Median (MD, inklusive Perzentile), das Maximum (Max.), der MW (inklusive Abweichung), der CV, die dazugehörige Standardabweichung (SD) und die absolute und relative Abweichung vom Zielwert durch einfaches Einfügen der Messergebnisse berechnet werden. Regressionsanalysen und prozentuale Abweichungen stellten gute Parameter dar, um die Linearität und den Patientenvergleich zu analysieren.

Die Serien- und Tag-zu-Tag-Präzisionen und die Patientenvergleiche von CSA und TAC, die weniger als 30 Werte umfassten, mussten mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft werden. Die Erstellung der zusammenfassenden Abbildungen der Präzisionen (Abbildung 9 und 10) geschah über MS-Excel.

Für die Patientenvergleiche wurde anschließend mittels „R“ [73] die Deming-Regression und der Pearsons´r, der auf Korrelation testet, berechnet. Die Abbildungen sind ebenfalls von „R“ [73], die Quotienten der Varianzen (*Error-Ratio*) wurden für alle Vergleiche berücksichtigt und für die Konfidenzintervalle (KI) wurde das Jackknife-Bootstrapping angewendet. Um Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Methoden statistisch feststellen zu können, wurden in MS-Excel für alle Vergleiche jeweils ein Student´s T-Test (Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest)) berechnet. Wenn sinnvoll wurde die Effektstärke anhand des Cohen´s d beurteilt.

Die Ergebnisse der Linearität wurden zunächst mittels Residualanalyse und F-Test auf Varianzenhomogenität analysiert. Darauf folgte der Linearitätstest nach Mandel. Hierbei erzeugt man eine Ausgleichsrechnung (*fitting*), für ein lineares Modell, ein quadratisches Modell und eines Modells dritten polynomischen Grades. Ist das lineare Modell, jenes mit dem niedrigsten P-Wert, passt dieses am besten zu den Ergebnissen. Man kann nun von einer Linearität der Werte ausgehen. Diese drei Tests wurden ebenfalls durch „R“

[73] ausgewertet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse eignete sich wiederum MS-Excel.

Bei der Patientenverfolgung wurde Wert daraufgelegt, wie der Kliniker mit den einzelnen Ergebnissen umgeht, daher verzichtete man bewusst auf eine statistische Auswertung, ausgenommen eine graphische Darstellung in Form eines Verlaufsdigrammes, erstellt in MS-Excel.

Die Berechnungen zur *turn-around*-Zeit wurden mittels „R“ [73] ausgewertet und durch MS-Excel graphisch dargestellt. Die Auswertung der *hands-on*-Zeit wurde ebenfalls mittels MS-Excel realisiert.

4. Ergebnisse

4.1. Evaluierung

4.1.1. Serienpräzision

Bei der Serienpräzision konnten innerhalb kürzester Zeit stabile Werte für 20 Messungen in Folge erreicht werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Serienpräzision erhält man anhand der Tabelle 8 und Abbildung 9.

Tabelle 8: CVs der Serienpräzisionen für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)

Substanz	CV in %		
	Kontrolle tief	Kontrolle hoch	Patienten-Pool 1
CSA	6,52	3,79	5,17
TAC	5,13	4,2	4,3
SIR	7,18	3,92	5,5
EVE	6,3	5,68	5,71

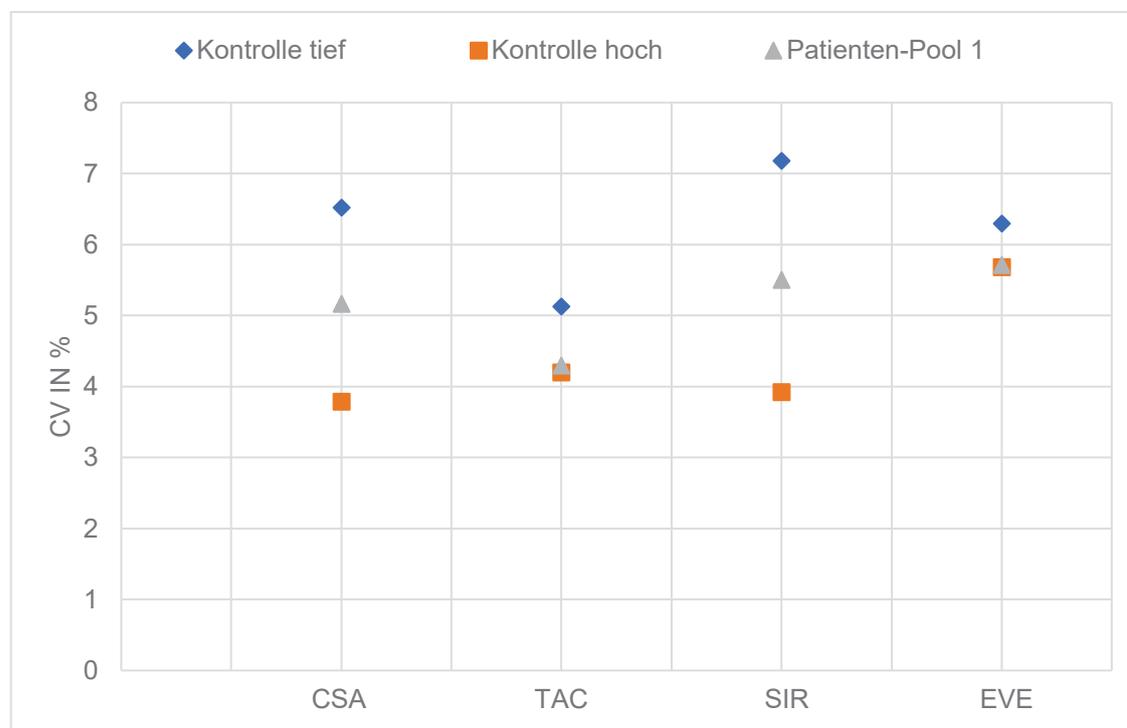


Abbildung 9: Bildliche Darstellung der CVs der Serienpräzisionen für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)

Für die Kontrollen wurden die Immunsuppressiva dem EDTA-Vollblut in einer Konzentration zugesetzt, die entweder einen hohen Spiegel (für CSA bei über 500 µg/l

und für die übrigen Immunsuppressiva bei über 20 µg/l) oder einen eher niedrigen Spiegel (für CSA unter 50 µg/l und für die anderen unter 3 µg/l) erzeugte. Für den Patienten-Pool 1 wurden EDTA-Vollblutproben von zwei Patienten, die jeweils mit CSA oder TAC behandelt wurden, vereint. Dem Gemisch wurden dann EVE und SIR in Therapie-äquivalenten Konzentrationen zugesetzt.

Untenstehende Ergebnisse wurden für das jeweilige Immunsuppressivum ermittelt (siehe Tabelle 9-12). Die für die Ergebnisse ausschlaggebenden Werte, die MW und die CVs, sind grau unterlegt.

Tabelle 9: CSA-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchgangs)

CSA	Kontrolle tief	Kontrolle hoch	Patienten-Pool 1
n	20	20	20
MW	33,411	680,415	58,694
SD	2,177	25,811	3,034
CV (%)	6,52	3,79	5,17
2s-Bereich	29,057 - 37,765	628,793 - 732,037	52,626 - 64,762
MD	33,28	680,35	58,41
Min.	28,58	625,7	53,69
Max.	36,68	729,9	63,64

Werte in µg/l ausgenommen CV und n

Tabelle 10: TAC -Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchgangs)

TAC	Kontrolle tief	Kontrolle hoch	Patienten-Pool 1
n	20	20	20
MW	2,668	22,495	4,585
SD	0,137	0,944	0,197
CV (%)	5,13	4,2	4,3
2s-Bereich	2,394 - 2,942	20,607 - 24,383	4,191 - 4,979
MD	2,69	22,48	4,53
Min.	2,302	21,08	4,27
Max.	2,88	24,81	5,03

Werte in µg/l ausgenommen CV und n

Tabelle 11: SIR-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchgangs)

SIR	Kontrolle tief	Kontrolle hoch	Patienten-Pool 1
n	20	20	20
MW	2,561	24,237	2,889
SD	0,184	0,95	0,159
CV (%)	7,18	3,92	5,5
2s-Bereich	2,193 - 2,929	22,337 - 26,137	2,571 - 3,207
MD	2,56	24,13	2,88
Min.	2,337	22,62	2,556
Max.	2,941	25,92	3,293

Werte in µg/l ausgenommen CV und n

Tabelle 12: EVE-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchgangs)

EVE	Kontrolle tief	Kontrolle hoch	Patienten-Pool 1
n	20	20	20
MW	2,586	26,864	3,169
SD	0,163	1,526	0,181
CV (%)	6,3	5,68	5,71
2s-Bereich	2,26 - 2,912	23,812 - 29,916	2,807 - 3,531
MD	2,64	26,78	3,19
Min.	2,266	24,45	2,857
Max.	2,915	30,84	3,465

Werte in µg/l ausgenommen CV und n

29

4.1.2. Tag-zu-Tag-Präzision

Für die Tag-zu-Tag-Präzisionen wurden fünf Proben verwendet. Wichtig bei dieser Präzision war, dass die Werte nicht nur innerhalb eines Tages, wie bei der Serienpräzision, sondern auch über mehrere Tage hinweg konstant blieben. Die Kontrollen eins bis vier des Kits (QC 1-4) stellten vier der Tag-zu-Tag-Präzisionen dar, die andere Präzision der Patienten-Pool 1. Als Zielwerte galten für die Kontrollen die Herstellerangaben, beim Patienten-Pool 1 gab es keinen Zielwert, da der wahre Wert nicht bekannt war. Um für alle Immunsuppressiva akzeptable Ergebnisse zu erhalten waren zwei Durchgänge à 20 Werten notwendig. Der Tabelle 13 und der Abbildung 10 kann man eine Übersicht der Ergebnisse entnehmen.

Tabelle 13: CVs der Tag-zu-Tag-Präzision für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

Substanz	CV in %				
	QC 1	QC2	QC3	QC4	Patienten-Pool 1
CSA	7,73	6,68	7,33	7,31	5,28
TAC	8,96	6,86	7,07	7,72	7,28
SIR	7,4	7,61	8,47	7,59	7,36
EVE	7,72	8,36	8,81	6,64	7,47

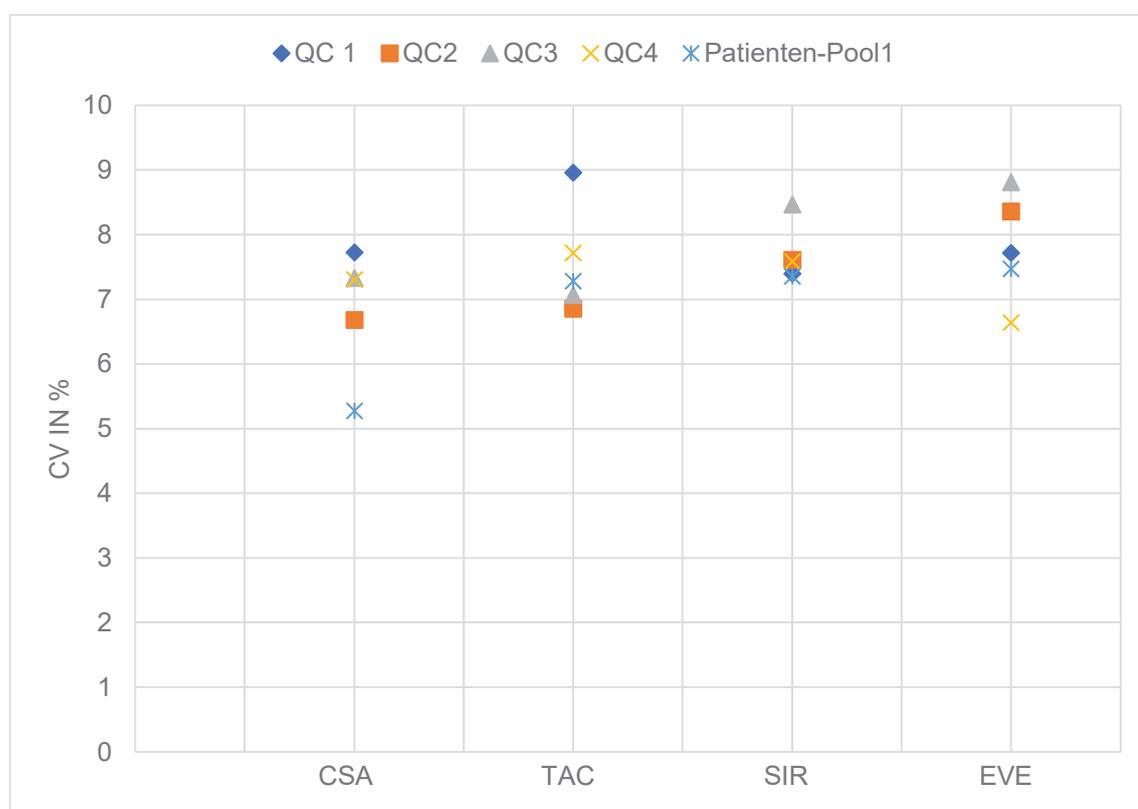


Abbildung 10: Bildliche Darstellung der CVs in Prozent der Tag-zu-Tag-Präzision für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

Die fünf Proben liefen an verschiedenen Tagen, höchstens zwei Werte in unabhängigen Durchgängen pro Tag, auf der LC-MS/MS und es wurden die untenstehenden Resultate ermittelt (siehe Tabelle 14-17). Auch hier sind der MW und der CV grau hinterlegt. Zusätzlich zu den bei der Serienpräzision wichtigen Werte wurden bei der Tag-zu-Tag-Präzision für die vier Kontrollen auch die absolute und relative Abweichung vom Zielwert betrachtet. Letzteres ebenfalls, zusammen mit dem Zielwert, grau hinterlegt. Für

die Kontrollen wurden außerdem die Referenzbereiche des Herstellers zur Orientierung angegeben.

Tabelle 14: CSA-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

CSA	Patienten-				
	QC1	QC2	QC3	QC4	Pool 1
n	20	20	20	20	20
Zielwert	50,3	246	492	1137	
Referenzbereich	40,2-60-3	197-295	394-591	910-1364	
MW	49,231	244,372	486,186	1154,579	62,896
SD	3,805	16,314	35,648	84,408	3,324
CV (%)	7,73	6,68	7,33	7,31	5,28
2s-Bereich	41,621 -		414,89 -	985,763 -	56,248 -
	56,841	211,744 - 277	557,482	1323,395	69,544
MD	49,34	243,25	487,51	1144,08	62,17
Min.	43,441	217,484	420,958	994,637	58,603
Max.	56,674	285,6	566,2	1307	72,053
Abweichung abs.	-1,069	-1,628	-5,814	17,579	
Abweichung (%)	-2,13	-0,66	-1,18	1,55	

Werte in µg/l ausgenommen CV, n und Abweichung %

31

Tabelle 15: TAC-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

TAC	Patienten-				
	QC1	QC2	QC3	QC4	Pool 1
n	20	20	20	20	20
Zielwert	2,75	7,51	15,7	33,2	
Referenzbereich	1.93-3,58	5,63-9,39	11,8-19,7	24,9-41,5	
MW	2,6	7,22	15,577	32,622	4,984
SD	0,233	0,495	1,102	2,191	0,363
CV (%)	8,96	6,86	7,07	6,72	7,28
2s-Bereich			13,373 -		
	2,134 - 3,066	6,23 - 8,21	17,781	28,24 - 37,004	4,258 - 5,71
MD	2,55	7,23	15,65	32,61	4,93
Min.	2,247	6,224	13,075	28,267	4,453
Max.	2,983	8,137	17,55	36,71	5,976
Abweichung abs.	-0,15	-0,29	-0,123	-0,578	
Abweichung (%)	-5,45	-3,86	-0,78	-1,74	

Werte in µg/l ausgenommen CV, n und Abweichung %

Tabelle 16: SIR-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

SIR	Patienten-				
	QC1	QC2	QC3	QC4	Pool 1
n	20	20	20	20	20
Zielwert	2,77	9,77	19,2	38,1	
Referenzbereich	1,8-3,74	7,33-12,2	14,4-24	30,5-45,7	
MW	2,744	9,53	18,782	37,603	3,235
SD	0,203	0,725	1,59	2,855	0,238
CV (%)	7,4	7,61	8,47	7,59	7,36
2s-Bereich			15,602 -	31,893 -	
	2,338 - 3,15	8,08 - 10,98	21,962	43,313	2,759 - 3,711
MD	2,71	9,33	18,71	37,18	3,24
Min.	2,386	8,327	16,066	32,344	2,815
Max.	3,116	11,28	21,65	43,18	3,693
Abweichung abs.	-0,026	-0,24	-0,418	-0,497	
Abweichung (%)	-0,94	-2,46	-2,18	-1,3	

Werte in µg/l ausgenommen CV, n und Abweichung %

Tabelle 17: EVE-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)

EVE	Patienten-				
	QC1	QC2	QC3	QC4	Pool1
n	20	20	20	20	20
Zielwert	2,48	4,58	9,03	30,5	
Referenzbereich	1,66-3,3	3,21-5,95	6,77-11,3	24,4-36-6	
MW	2,293	4,474	8,698	29,937	3,333
SD	0,177	0,374	0,766	1,988	0,249
CV (%)	7,72	8,36	8,81	6,64	7,47
2s-Bereich				25,961 -	
	1,939 - 2,647	3,726 - 5,222	7,166 - 10,23	33,913	2,835 - 3,831
MD	2,28	4,47	8,45	30,39	3,26
Min.	1,961	3,837	7,681	25,6	2,822
Max.	2,603	5,334	10,29	32,4	3,81
Abweichung abs.	-0,187	-0,106	-0,332	-0,563	
Abweichung (%)	-7,54	-2,31	-3,68	-1,85	

Werte in µg/l ausgenommen CV, n und Abweichung %

4.1.3. Patientenvergleich

Für alle Immunsuppressiva wurden beim Patientenvergleich eindeutige Ergebnisse erzielt (siehe Tabelle 18-23). Die Korrelation nach Pearson war stets gleich oder größer 0,9 und auch die Steigung der Deming-Regression zeigte, dass die Methoden korrelierten, da stets Werte größer 0,89 berechnet worden sind (erkennbar an den Abbildungen 11-16, erstellt mit „R“ [73]).

Statistisch zeigte sich dies auch mit dem T-Test, der prüft, ob sich die MWs einer Stichprobe unterscheiden. Für CSA und TAC war dieser Test hoch signifikant, sodass über diesen, die MWs und den Korrelationskoeffizient bewiesen wurde, dass die gemessenen Werte der LC-MS/MS relevant niedriger sind als die der Immunoassays. Die Effektstärke wurde mittels Cohen's d berechnet. Für CSA zeigte sich nur ein sehr schwacher Effekt ($<0,1$), für TAC ein schwacher ($>0,1$). Dies scheint verständlich, wenn man bedenkt, dass auch die Immunoassays schon gute und stabile Werte für die Immunsuppressiva-Spiegel messen. Der Patientenvergleich für CSA und TAC, der LC-MS/MS mit LC-MS/MS verglichen, ergab ebenfalls signifikante T-Tests. Die Ergebnisse der LC-MS/MS des Fremdlabors waren verschieden zu denen, die im Zentrallabor gemessen worden sind.

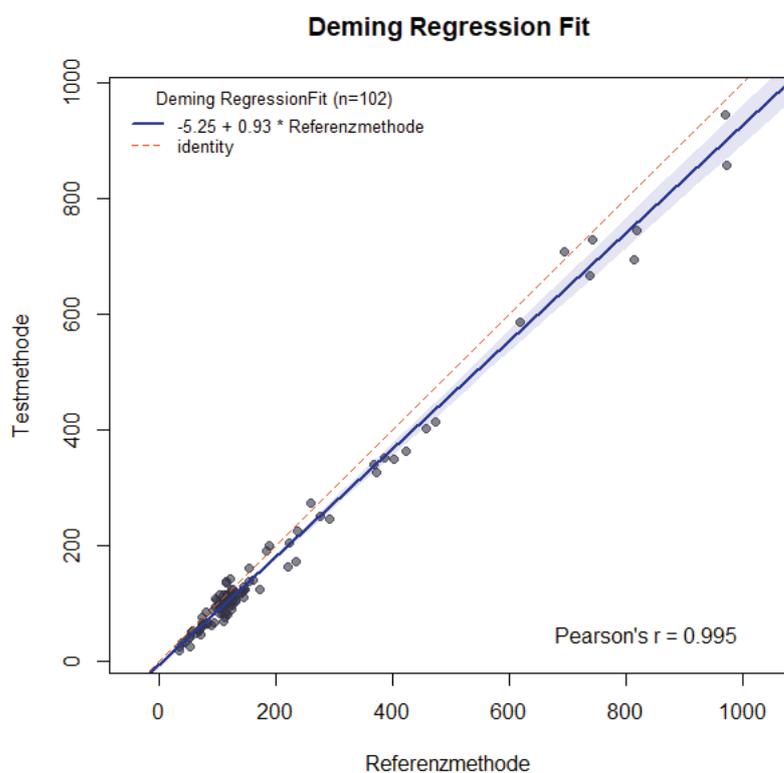
Für SIR und EVE verhielt es sich anders. Über den hier nicht statistisch signifikanten T-Test zeigte sich, dass die Werte der LC-MS/MS vom Fremdlabor und der LC-MS/MS des UKDs sich mit der aktuellen Charge nicht signifikant voneinander unterschieden. Der Korrelationskoeffizient belegte einen hohen Zusammenhang zwischen den Messungen.

33

Tabelle 18: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 103 CSA-Proben (gemessen mit LC-MS/MS und Immunoassay)

CSA	Immunoassay	LC-MS/MS	
MW	189,4368932	171,6113495	
SD	200,0942753	186,7554173	
CV (%)	105,6258218	108,8246307	
Max.	971	944,129	
Min.	34	19,225	
n	103	103	
Deming-Regression		95%-KI	
Steigung A	0,9334445	0,8956275-0,9720307	
Abschnitt B	-5,2546969	-10,7267308-0,5034314	
Pearson Korrelation	0,995		
T-Test		Cohen's d	
Freiheitsgrade	102	M1-M2	17,8255437
t-Statistik	7,5820945	Pooled SD	193,5397955
P(T<=t) zweiseitig	1,6236E-11	Cohens's d	0,09210273
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	1,98349526		

Wenn Einheit benötigt in µg/l



The 0.95-confidence bounds are calculated with the bootstrap(quantile) method.

Abbildung 11: Vergleich von CSA-Spiegeln gemessen in 103 Proben mit Immunoassay (Abszisse) und LC-MS/MS (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,99$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

Tabelle 19: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 152 TAC-Proben (gemessen mit LC-MS/MS und Immunoassay)

TAC	Immunoassays	LC-MS/MS
MW	8,220394737	7,346614474
SD	5,129699768	4,919067826
CV (%)	62,40211002	66,95693429
Max.	29,7	27,219
Min.	1,2	0,884
n	152	152

Deming-Regression	95%-KI	
Steigung A	0,9575713	0,9185800 -1,0058408
Abschnitt B	-0,5371700	-0,8508572- (-0,2838152)
Pearson Korrelation	0,984	

T-Test		Cohen's d	
Freiheitsgrade	151	M1-M2	0,87378026
t-Statistik	11,6852576	Pooled SD	7,795756341
P(T<=t) zweiseitig	7,0926E-23	Cohen's d	0,11208409
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	1,97579892		

Wenn Einheit benötigt in µg/l

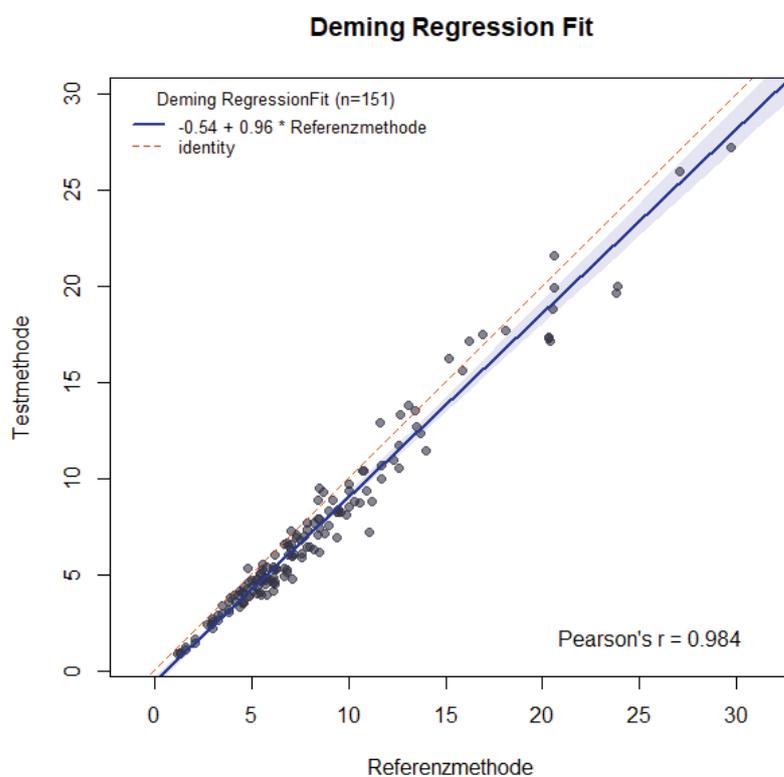


Abbildung 12: Vergleich von TAC-Spiegeln gemessen in 152 Proben mit Immunoassay (Abszisse) und LC-MS/MS (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,98$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

Tabelle 20: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 19 CSA-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)

CSA 2	LC-MS/MS	
	Fremdversand	LC-MS/MS UKD
MW	204,0368421	185,3314211
SD	144,3954917	135,5445363
CV (%)	70,76932292	73,13629578
Max.	567	526,226
Min.	31,3	34,383
n	19	19

Deming-Regression	95%-KI	
Steigung A	0,9387034	0,8735654-0,9908346
Abschnitt B	-6,1986526	-15,0150912-2,4347895
Pearson Korrelation	0,991	

T-Test	Cohen's d	
Freiheitsgrade	18	M1-M2 18,7054211
t-Statistik	3,98072586	Pooled SD 194,9086563
P(T<=t) zweiseitig	0,00087667	Cohen's d 0,09597019
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,10092204	

Wenn Einheit benötigt in µg/l

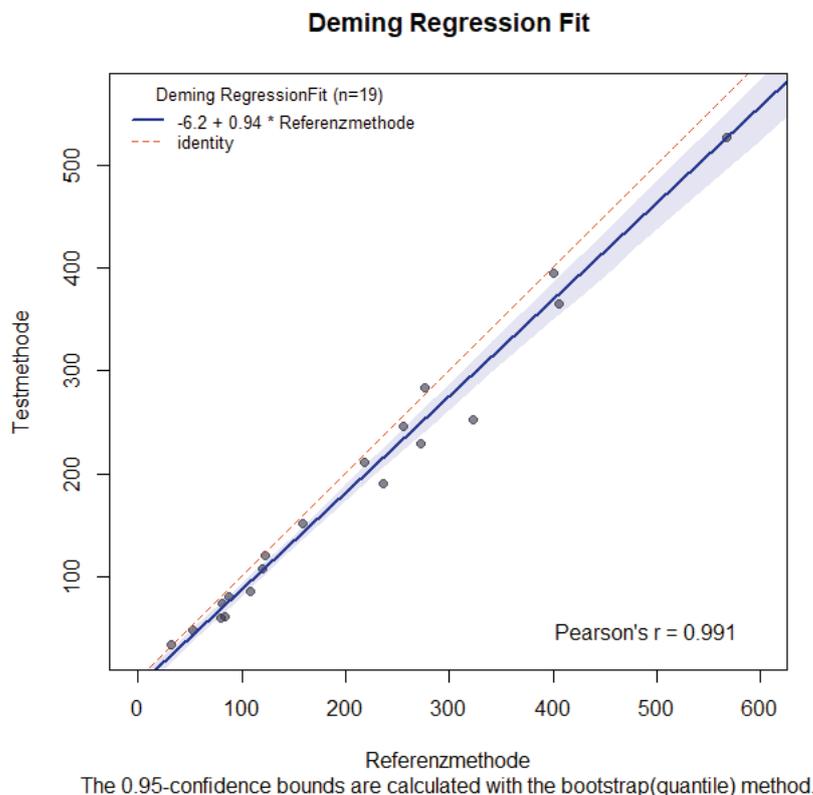


Abbildung 13: Vergleich von CSA-Spiegeln gemessen in 19 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,95$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

Table 21: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 19 TAC-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)

TAC 2	LC-MS/MS	
	Fremdversand	LC-MS/MS UKD
MW	11,07210526	10,003
SD	6,844669117	6,592618515
CV (%)	61,81903942	65,90641323
Max.	22,6	21,932
Min.	1,96	1,301
n	19	19

Deming-Regression	95%-KI	
Steigung A	0,9631756	0,8000246-1,1130109
Abschnitt B	-0,661382	-1,922918-0,4720604
Pearson Korrelation	0,961	

T-Test	Cohen's d		
Freiheitsgrade	18	M1-M2	1,06910526
t-Statistik	2,47670211	Pooled SD	10,55110241
P(T<=t) zweiseitig	0,02341334	Cohen's d	0,1013264
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,10092204		

Wenn Einheit benötigt in µg/l

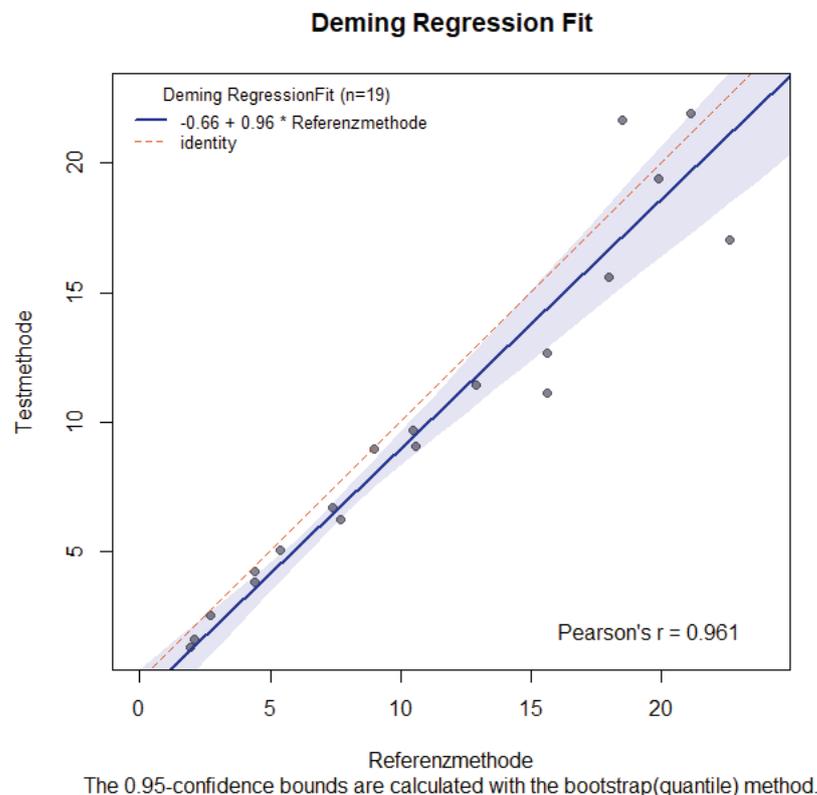


Abbildung 14: Vergleich von TAC-Spiegeln gemessen in 19 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,95$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

Tabelle 22: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 34 SIR-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)

SIR	LC-MS/MS	
	Fremdversand	LC-MS/MS UKD
MW	5,449117647	5,426676471
SD	2,451220312	2,184019338
CV (%)	44,98380234	40,24598388
Max.	10,7	10,474
Min.	1,43	1,659
n	34	34

Deming-Regression	95%-KI	
Steigung A	0,8909927	0,77055637-1,003609
Abschnitt B	0,5715526	0,05021475-1,209837
Pearson Korrelation	0,943	

T-Test	
Freiheitsgrade	33
t-Statistik	0,15793164
P(T<=t) zweiseitig	0,87547312
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,0345153

Wenn Einheit benötigt in µg/l

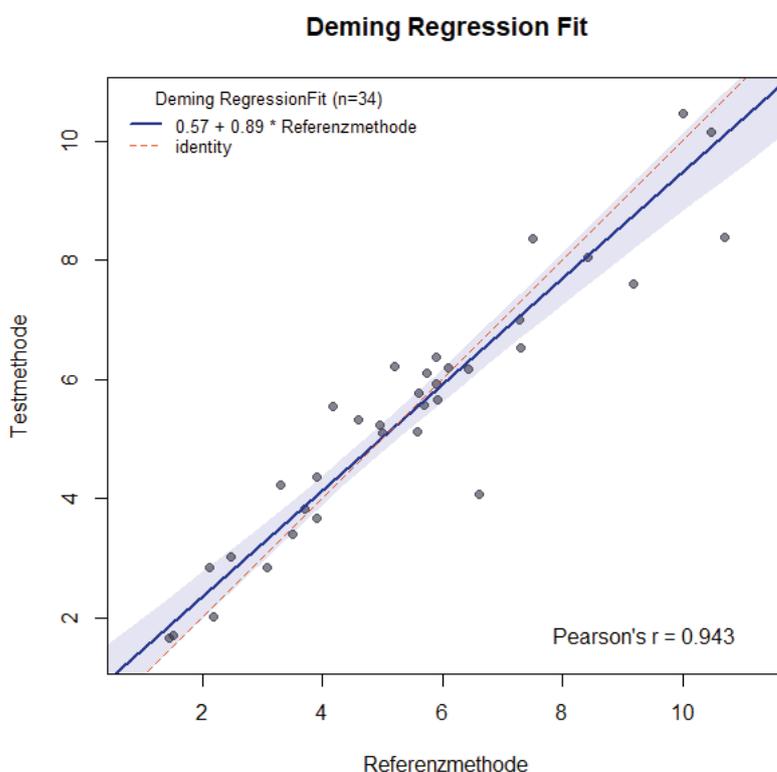


Abbildung 15: Vergleich von SIR-Spiegeln gemessen in 34 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,94$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

Tabelle 23: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 98 EVE-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)

EVE	LC-MS/MS	
	Fremdversand	LC-MS/MS UKD
MW	5,299897959	5,263865306
SD	3,234538637	2,937650153
CV (%)	61,0302059	55,80785188
Max.	19,9	16,773
Min.	1,4	1,124
n	98	98

Deming-Regression	95%-KI	
Steigung A	0,8986054	0,8162575-1,0522354
Abschnitt B	0,4896261	-0.2140489-0.8925684
Pearson Korrelation	0,954	

T-Test	
Freiheitsgrade	97
t-Statistik	0,36823665
P(T<=t) zweiseitig	0,71349917
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	1,98472319

Wenn Einheit benötigt in µg/l

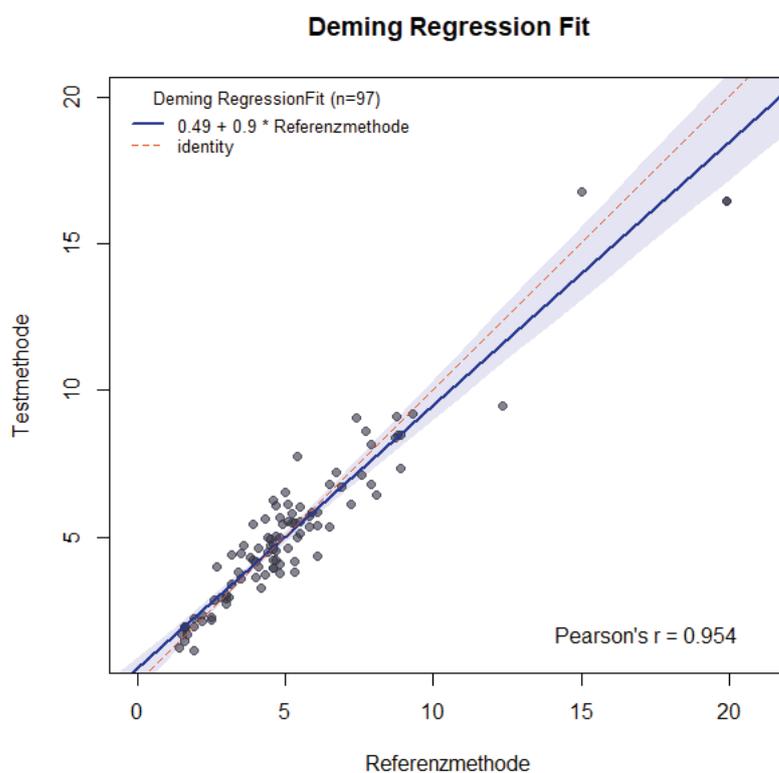


Abbildung 16: Vergleich von EVE-Spiegeln gemessen in 98 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate): Durchgezogene und gestrichelte Linien stellen MW bzw. 95% KI der Deming-Regression ($r > 0,95$) dar, Werte in µg/l, erstellt mit der Software „R“

4.1.4. Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurde der dritte Patienten-Pool hergestellt (Patienten-Pool 3), seriell verdünnt und zweimal pro Immunsuppressivum gegemessen.

Die Messungen mit der LC-MS/MS waren für alle Immunsuppressiva mittels Linearitätstest nach Mandel linear, damit waren keine weiteren Testungen erforderlich. Dies gilt für den Bereich der 11 Level, also von 32,5-650 µg/l für CSA, 1,48-29,5 µg/l für TAC, 1,54-30,82 µg/l für SIR und 1,66-33,13 µg/l für EVE.

Der F-Test zeigte eine Varianzenhomogenität.

Der Korrelationskoeffizient (hier *multiple R²*) der Residualanalyse zwischen Zielwert und Sollwert zeigte für alle Immunsuppressiva ein Ergebnis deutlich über 0,99. Die Residualanalyse, erstellt mit „R“ [73] ergab für die Mittelwertgeraden der Analyten, mit SD in Klammern, folgende Werte:

- $CSA = 6,0206 (4,42218) + 1,00667 (0,01173) * x$
- $TAC = 0.39018 (0.28128) + 1.00327 (0.01649) * x$
- $EVE = 0.31982 (0.30692) + 1.01589 (0.01614) * x$
- $SIR = 0.01480 (0.21871) + 1.06363 (0.01277) * x$

Die Abbildungen 17-20 visualisieren die Ergebnisse. Die Werte der zwei Läufe (blaue und orangene Punkte) schwanken dabei um die Zielwerte der einzelnen Level (rote Linie), liegen jedoch in den allermeisten Fällen innerhalb der 10%-Abweichungsgeraden (schwarz gepunktete Linien).

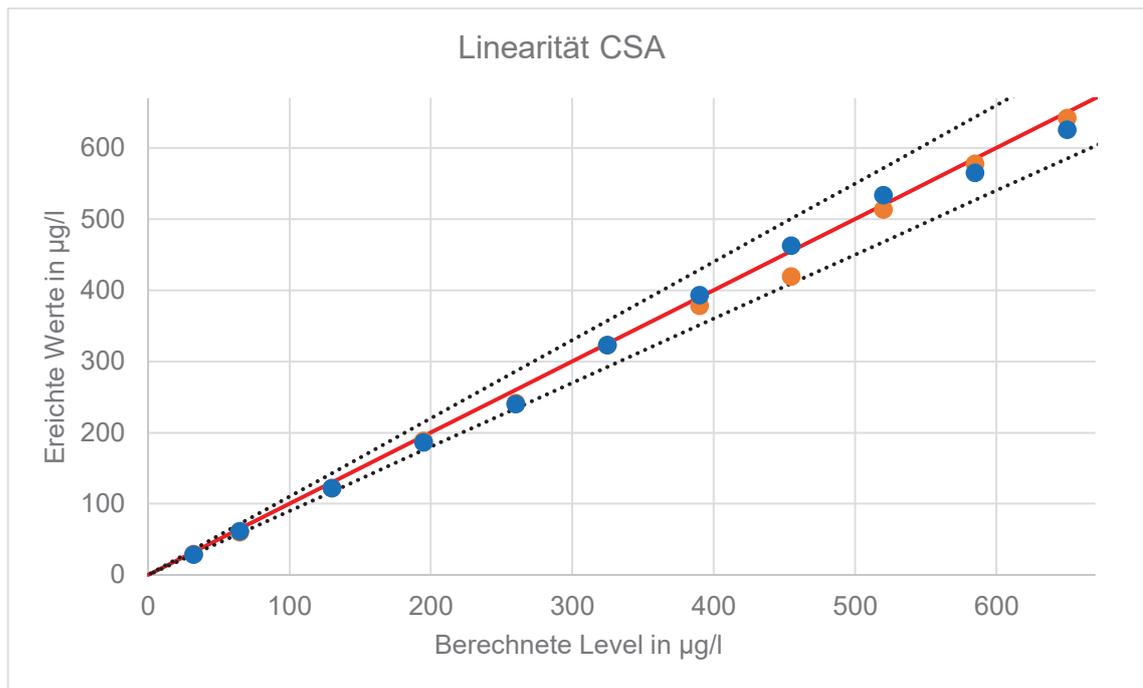


Abbildung 17: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für CSA (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen): Durchgezogene rote und gestrichelte schwarze Linien zeigen Zielwert bzw. Abweichungen vom Zielwert +/- 10%, orange Punkte Lauf 1, blaue Punkte Lauf 2

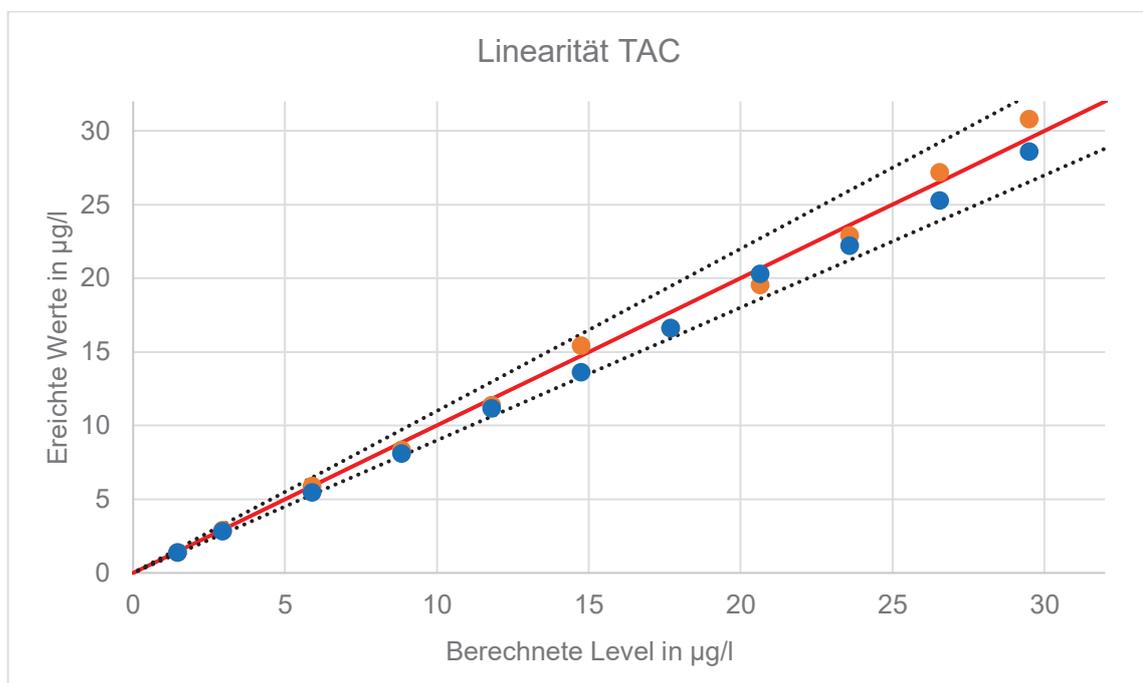


Abbildung 18: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für TAC (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen): Durchgezogene rote und gestrichelte schwarze Linien zeigen Zielwert bzw. Abweichungen vom Zielwert +/- 10%, orange Punkte Lauf 1, blaue Punkte Lauf 2

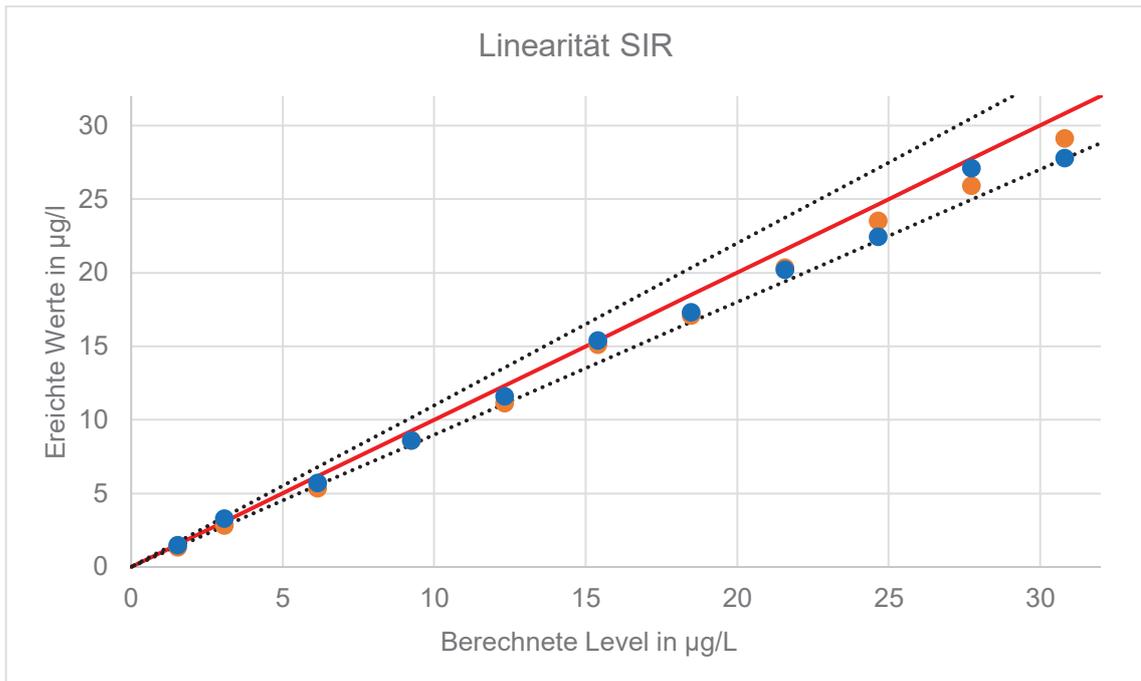


Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für SIR (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen): Durchgezogene rote und gestrichelte schwarze Linien zeigen Zielwert bzw. Abweichungen vom Zielwert +/- 10%, orange Punkte Lauf 1, blaue Punkte Lauf 2

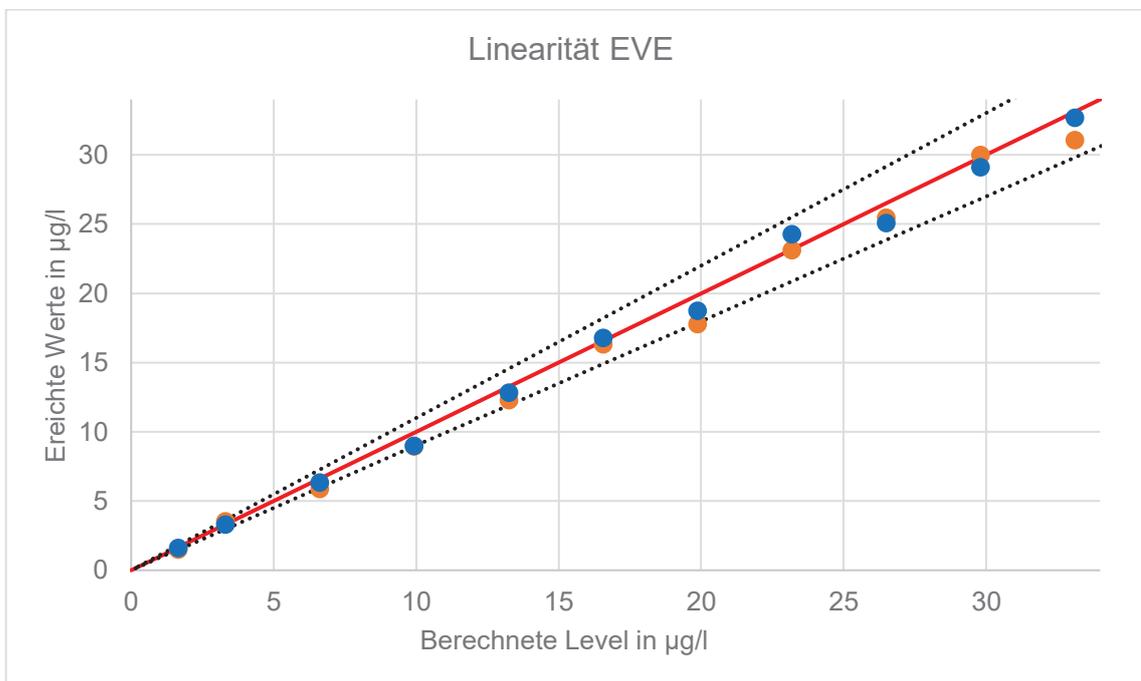


Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für EVE (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen): Durchgezogene rote und gestrichelte schwarze Linien zeigen Zielwert bzw. Abweichungen vom Zielwert +/- 10%, orange Punkte Lauf 1, blaue Punkte Lauf 2

4.2. Methodenvergleich

4.2.1. Patientenverfolgung

Die Patientenverfolgung wurde zur weiteren Analyse der Unterschiede zwischen LC-MS/MS und Immunoassays angefertigt. Die TAC-Spiegel der Patienten 3 und 4, gemessen mit den Immunoassays und der LC-MS/MS, sind dafür dreieinhalb Wochen ab dem 1. Tag nach der Herztransplantation beobachtet worden. Zwei Wochen wurden jeden Tag beide Methoden durchgeführt (Werte 1-14), danach noch zweimal die Woche für zwei Wochen (Werte 15-16 und 17-18). Zur Auswertung wurden die Werte (siehe Tabelle 24 und 25) miteinander verglichen und dem behandelnden Oberarzt vorgelegt. Die von der LC-MS/MS gemessenen Immunsuppressiva-Spiegel liegen stets unter denen der Immunoassays, was man sehr deutlich an den Abbildungen 21 und 22 erkennen kann. Laut des betreuenden Arztes werde man sich wahrscheinlich in Zukunft trotzdem weiterhin an die Referenzwerte halten, die sich beim Methodenwechsel nicht relevant geändert haben. Dies bedeutet für die Patienten, dass sie, im Vergleich, vermutlich mehr TAC erhalten werden.

Tabelle 24: 18 Messungen des TAC-Spiegels mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay über 3½ Wochen von Patient 3 im Zuge der Patientenverfolgung

Patient 3				
Wert	Datum	Woche	LC-MS/MS in µg/l	Immunoassay in µg/l
1	05.07.2020	1	2,59	3,3
2	06.07.2020		3,955	5,5
3	07.07.2020		5,915	7,6
4	08.07.2020		7,594	9
5	09.07.2020		7,198	11,1
6	10.07.2020		6,06	6,9
7	11.07.2020		5,369	6,7
8	12.07.2020	2	3,979	5,8
9	13.07.2020		8,561	10
10	14.07.2020		10,439	10,8
11	15.07.2020		27,219	29,7
12	16.07.2020		10,386	11,5
13	17.07.2020		10,436	12,4
14	18.07.2020		8,404	9,5
15	21.07.2020	3	5,312	6,5
16	24.07.2020		7,543	8,3
17	27.07.2020	4	9,054	10,6
18	30.07.2020		5,853	6,9

44

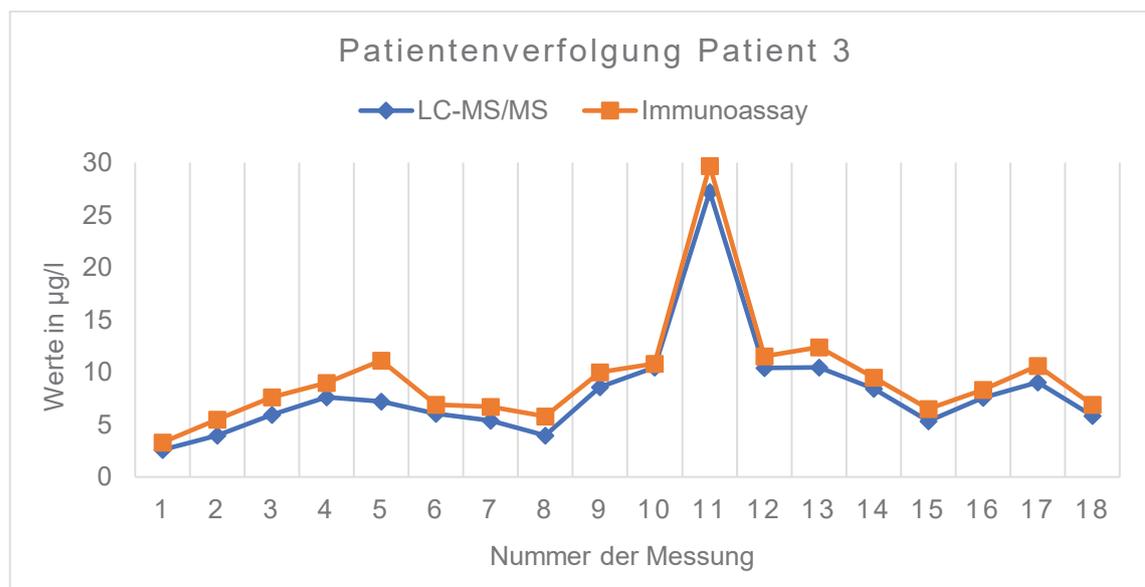


Abbildung 21: Verlauf des TAC-Spiegels (gemessen mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay) über 3½ Wochen von Patient 3 im Zuge der Patientenverfolgung: Die TAC-Spiegel (Ordinate) sind aufgetragen gegen die Nummerierung der Messung (Abszisse)

Tabelle 25: 18 Messungen des TAC-Spiegels mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay über 3½ Wochen von Patient 4 im Zuge der Patientenverfolgung

Patient 4					
Wert	Datum	Woche	LC-MS/MS in µg/l	Immunoassay in µg/l	
1	05.07.2020	1	1,455	2,1	
2	06.07.2020		2,674	3	
3	07.07.2020		3,889	4,9	
4	08.07.2020		4,696	5,6	
5	09.07.2020		4,802	7,1	
6	10.07.2020		5,951	7,1	
7	11.07.2020		6,176	8,5	
8	12.07.2020	2	6,951	9,4	
9	13.07.2020		9,301	8,7	
10	14.07.2020		8,359	9	
11	15.07.2020		8,917	9,2	
12	16.07.2020		9,965	10,8	
13	18.07.2020		7,929	8,4	
14	19.07.2020		4,852	5,7	
15	21.07.2020	3	6,157	6,3	
16	24.07.2020		7,892	8,5	
17	27.07.2020	4	3,689	4,6	
18	30.07.2020		12.667	15	

45

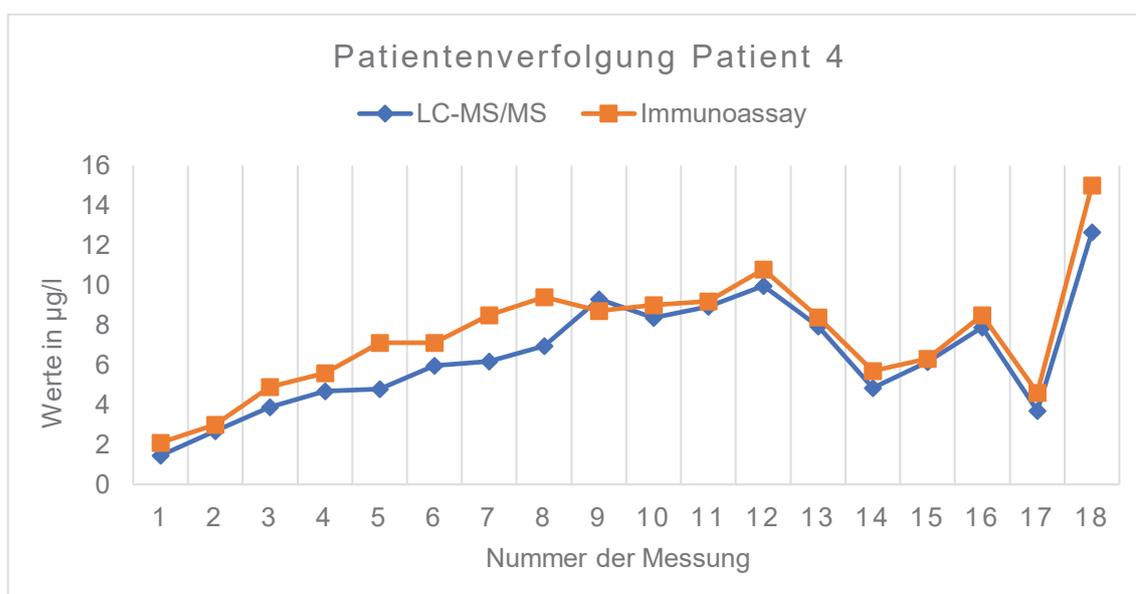


Abbildung 22: Verlauf des TAC-Spiegels (gemessen mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay) über 3½ Wochen von Patient 4 im Zuge der Patientenverfolgung: Die TAC-Spiegel (Ordinate) sind aufgetragen gegen die Nummerierung der Messung (Abszisse)

4.2.2. Zeitmanagement und Testverfügbarkeit

Durch die Aufarbeitung der Proben mittels Pipettierroboter hat sich die Zeit, welche ein Mitarbeiter für die Messungen der Immunsuppressiva-Spiegel aufbringen muss, verkürzt. Die manuelle Aufarbeitung für die Immunoassays hat eine Fachkraft pro Durchgang circa 20-25 Minuten gekostet. Interne Berechnungen zeigten, dass für die Immunoassays pro Probe 3 Minuten Arbeitszeit eingerechnet werden mussten.

Die Proben müssen für die Messungen mit der LC-MS/MS in den Roboter und nach Probenvorbereitung von dort in die HPLC überführt werden. Für die gesamte Messung benötigten die Mitarbeiter nach der Auswertung von 39 Durchgängen mindestens 0,76 Minuten und höchstens 3,04 Minuten pro Probe, unter anderem auch abhängig davon wie viele Proben auf einmal gemessen wurden. Die mittlere *hands-on*-Zeit ist im Vergleich zu den Immunoassays deutlich kürzer (Vergleiche Tabelle 26 und Abbildung 23). Auch ein Vorlauf und Nachlauf von Kalibratoren und Kontrollen ist nicht notwendig. Die Kalibratoren sind beim ersten Lauf des Tages und die Kontrollen bei jedem Lauf involviert. Dies spart morgens und nachmittags, im Gegensatz zu der Routine mit den Immunoassays, deutlich Zeit ein.

Bei den Immunoassays wurden bisher immer Messungen mit 15 Proben pro Durchgang durchgeführt, da das Lösungsmittel sehr flüchtig ist. Die letzten Proben der Durchgänge mit größerer Probenanzahl waren zum Zeitpunkt der Messung bereits mit zu wenig Lösungsmittel versehen, was die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigte. Für 15 bereits vorbereitete Proben benötigten die Immunoassays 18 Minuten. In der LC-MS/MS können nun theoretisch bis zu 192 Proben, auf dem Pipettierroboter sogar bis zu 288 Proben, in einem Durchgang bearbeitet werden. Bei einem Testaufkommen von 60-75 Proben täglich würden folglich sechs bis sieben Durchgänge (inkl. Kontroll- und Kalibratordurchgänge) bei den Immunoassays und nur ein Durchgang bei der LC-MS/MS von Nöten sein. Bei der LC-MS/MS hat man sich momentan auf einen Vormittags- und einen Nachmittagslauf von jeweils etwa 30-40 Proben geeinigt. Dies wird den klinischen Anforderungen an ein schnelles Testergebnis gerechter. Je mehr Proben gleichzeitig gemessen werden sollen, desto höher ist die absolute Zeitersparnis der LC-MS/MS gegenüber den Immunoassays.

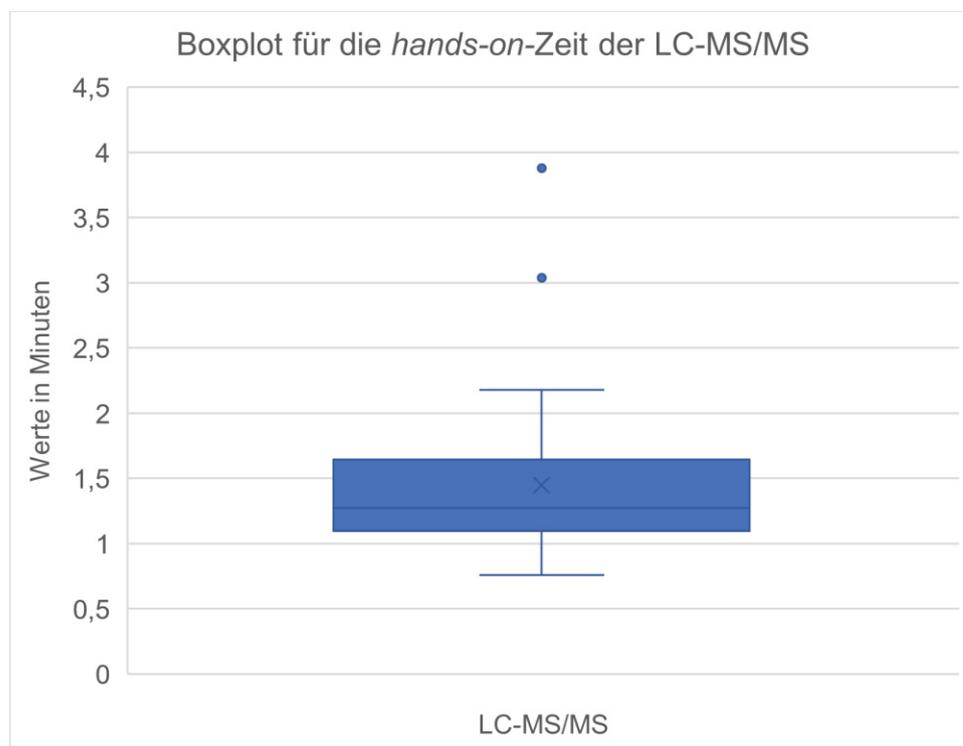
Die Vergleiche der Probelaufzeitmarken aus den Monaten Februar-März 2020 und 2021 ergaben, dass die *turn-around*-Zeiten der LC-MS/MS im Mittel 3,5 Stunden länger sind als die der Immunoassays. Die Freigabezeiten der Proben aus dem Fremdversand lagen deutlich (>45 Stunden länger) über denen von Immunoassays und LC-MS/MS. Die

Tabelle 27 und Abbildung 24 verdeutlichen die Ergebnisse. Folglich ist die Zeit, bis der Kliniker auf Station das Ergebnis für seine angeforderte Probe erhält, durch die Umstellung auf die LC-MS/MS, verlängert für CSA und TAC, jedoch verkürzt für SIR und EVE.

Tabelle 26: Vergleich der hands-on-Zeit für die beiden verwendeten Methoden im Zeitraum von Februar bis Mai 2021 (LC-MS/MS)

	LC-MS/MS	Immunoassays
n	39	
Min	0,76	
Max	3,04	
Median	1,27	
MW	1,45	3
SD	0,59	
CV (%)	40,5	
25%-Quartil	1,1	
75%-Quartil	1,62	

Alle Werte, außer CV und n, in Minuten



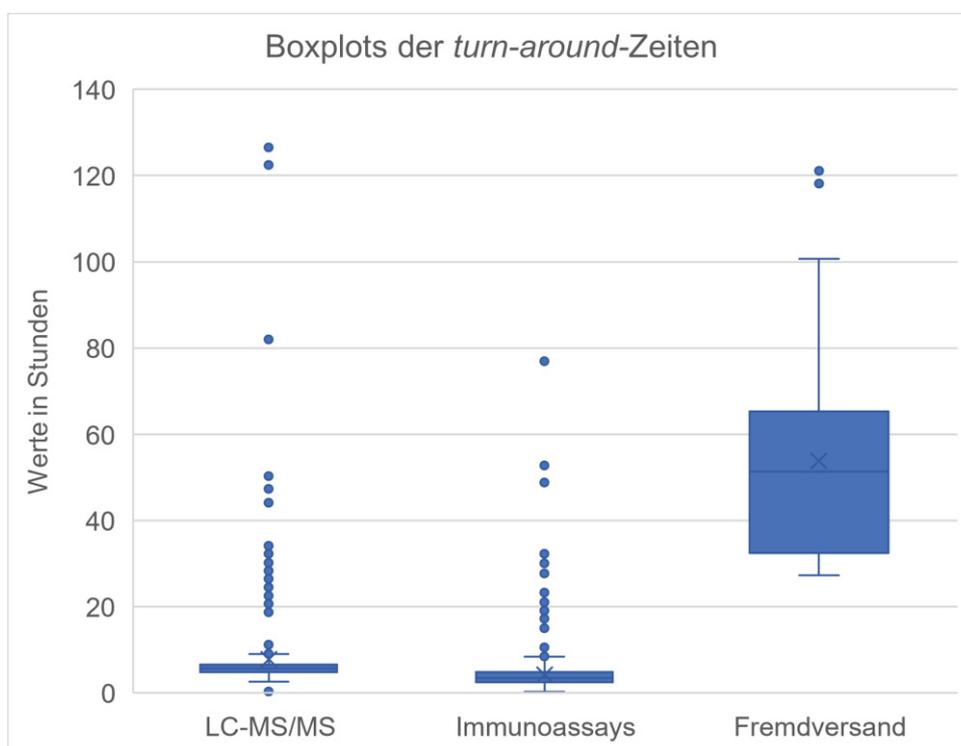
47

Abbildung 23: Boxplot der hands-on-Zeit für die LC-MS/MS im Zeitraum von Februar bis Mai 2021, die entsprechenden Werte für die Berechnung kann man der Tabelle 26 entnehmen

Tabelle 27: Vergleich der turn-around-Zeiten der drei verwendeten Methoden im Zeitraum vom 01.02.-31.03.2020 (Immunoassays und Fremdversand) und 01.02.-31.03.2021 (LC-MS/MS)

	LC-MS/MS UKD	Immunoassays	LC-MS/MS Fremdversand
n	2993	2167	94
Min	0,38	0,34	27,3
Max	126	77	121
Median	5,7	3,5	51,3
MW	7,8	4,3	53,8
SD	8,4	3,8	22,2
CV (%)	1,07	0,88	0,41
25%-Quantil	3,7	1,6	27,8
75%-Quantil	6,6	4,9	63,3

Alle Werte, außer CV und n, in Stunden



48

Abbildung 24: Boxplots der turn-around-Zeiten für die drei verwendeten Methoden im Zeitraum vom 01.02.-31.03.2020 (Immunoassays und LC-MS/MS des Fremdversands) und 01.02.-31.03.2021 (LC-MS/MS UKD), die entsprechenden Werte für die Berechnung kann man der Tabelle 26 entnehmen

4.2.3. Wirtschaftlichkeit

Für die Berechnungen der Wirtschaftlichkeit wird von der Probenanzahl des Zentrallabors des Universitätsklinikums Düsseldorf von 2019 ausgegangen. Der Preis pro Probe auf einer LC-MS/MS liegt bei etwa der Hälfte des Preises einer Probe eines Immunoassays und nur bei circa einem Fünftel des Preises für den Fremdversand. Der

Anschaffungspreis einer LC-MS/MS ist bekanntermaßen sehr hoch. Hier liegen wir bei >250.000 € pro Gerät (inklusive Pipettierroboter, Software und Materialkosten für die Evaluierung). Die Wartungskosten liegen bei > 25.000 € im Jahr.

Trotz des hohen Anschaffungs- und Wartungspreises hat sich nach spätestens 4,858 Jahren, bei gleichbleibendem Probendurchlauf, der Kauf einer LC-MS/MS rentiert. Man kann jedes Jahr mindestens ein Drittel der Material- bzw. Probenkosten bei der Umstellung einsparen. Die Anschaffung einer LC-MS/MS wird sich aller Erwartung nach sogar deutlich früher auszahlen, da eine Aufstockung des Probendurchlaufs von ca. 19.000 auf 24.000 Proben jährlich geplant ist. Außerdem ist die *hands-on*-Zeit eines geschulten Mitarbeiters an der deutlich LC-MS/MS geringer, sodass zusätzlich Mitarbeiterkosten verringert werden können.

Die genauen Zahlen unterstehen dem Datenschutz und können daher hier nicht offengelegt werden.

5. Diskussion

Im Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde eine LC-MS/MS für die Routinemessungen von Immunsuppressiva-Spiegeln erfolgreich etabliert. Evaluiert wurde ein Immunsuppressiva Kit für CSA, TAC, SIR und EVE mittels Serienpräzision, Tag-Zu-Tag-Präzision, Linearität und Patientenvergleich. Der Patientenvergleich war ebenso Teil des Methodenvergleichs zwischen der LC-MS/MS und den Immunoassays zusammen mit der Patientenverfolgung und den Analysen zur Testverfügbarkeit und Wirtschaftlichkeit. Bei dem Methodenvergleich zeigte sich, dass die Werte für die Immunsuppressiva der LC-MS/MS im Vergleich zu denen der Immunoassays tiefer liegen. Außerdem scheint die LC-MS/MS nach sorgfältiger Einarbeitung die für das Personal zeitsparendere Methode zu sein. Die Kliniker müssen dafür jedoch länger auf das Ergebnis warten. Die LC-MS/MS wird, trotz der hohen Anschaffungskosten, ab allerspätestens 4,858 Jahren kostengünstiger sein.

5.1. Diskussion der Methodik

50

5.1.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv für den Patientenvergleich bestand aus den Routineblutentnahmen des Universitätsklinikums Düsseldorf und den angeforderten Blutproben des Fremdlabors. Es mussten keine zusätzlichen Blutentnahmen bei Patienten stattfinden. Die Evaluierung war mit den Kontrollen des Herstellers, Verdünnungen der Reinsubstanzen der Immunsuppressiva oder eigenem Vollblut durchgeführt worden. Durch diese Art der Probengewinnung konnte die Evaluierung der LC-MS/MS zügig erfolgen. Problematisch waren jedoch drei Punkte.

Erstens: Bei der Verdünnung von Reinsubstanzen mit Acetonitril entstand eine andere Matrix als die von EDTA-Vollblut. Unklar ist inwieweit dies den Aufarbeitungs- und Messvorgang der LC-MS/MS beeinträchtigt hat [74], sodass die errechnete Konzentration der Immunsuppressiva in der Verdünnung nie als Zielwert verwendet wurde.

Zweitens: EVE und vor allem SIR werden deutlich seltener verschrieben als CSA und TAC. Dadurch konnte bei dem Patientenvergleich von SIR nur eine Anzahl von 34 Proben erreicht werden, wohingegen bei den anderen Immunsuppressiva jeweils mehr als 100 Proben verglichen werden konnten. Ähnliche Studien berichteten von analogen

Schwierigkeiten, selbst wenn diese deutlich mehr Patientenproben eingeschlossen hatten [75, 76].

Drittens: Es gab für CSA, SIR und EVE, das Problem, dass diese selten im hochtherapeutischen Bereich gegeben werden. Um aber auch in diesem Bereich Daten für die Evaluation und den Methodenvergleich zu erhalten wurde hier teilweise mit Reinsubstanz aufpipettiert.

Mit einem endgültigen Probendurchsatz von 425 verwerteten Proben für den Patientenvergleich waren für die Etablierung ausreichend Messungen angestellt worden. Zweifellos gab es deutlich größere Studien z.B. in Korea, Italien oder Schweden [75, 77, 78] andererseits jedoch auch Kleinere [79, 80].

5.1.2. Pipettierroboter

Der Pipettierroboter ist für die vollständige Probenvorbereitung zuständig. Die Proben müssen nur auf die *Racks* des Roboters gestellt werden und können nach der Bearbeitung direkt in die LC-MS/MS auf einer *Collection Plate* überführt werden. Durch die Schnelligkeit und das einfache Handling des Gerätes sollte diese Art der Aufarbeitung in der Routinediagnostik der manuellen Aufarbeitung vorgezogen werden. Auch weitere Studien und Erfahrungsberichte zeigen, dass es sich durchaus lohnt mit einem Pipettierroboter zu arbeiten, auch wenn sich die CVs dadurch nicht zwangsweise verbessern [81, 82].

Einzig ersichtlicher Nachteil ist, dass der Roboter für alle Proben und Lösungen eine gewisse Mindestmenge benötigt. Während man bei der manuellen Aufarbeitung nur die tatsächlich benötigten 50 µl braucht [55], lag man bei den Proben für den Roboter bei ca. 400 µl für die EDTA-Röhrchen und bei 250-300 µl für die *Microtainer* aus der Kinderklinik. Dies könnte bzgl. der oft geringen Probenmenge bei Kindern problematisch werden.

In einer anderen Studie, in der kein Pipettierroboter verwendet wurde, wird als Nachteil des kommerziellen Immunsuppressiva-Kits auch die aufwendigere Probenaufarbeitung genannt. Diese enthält wohl im Vergleich zu deren eigenem LC-MS/MS-Assay einen Inkubationsschritt mehr [79]. Dieser Nachteil entfällt bei automatisierter Probenvorbereitung, da sich die *hands-on-Zeit* nicht verlängert.

5.1.3. LC-MS/MS

Die LC-MS/MS kann mittels ESI und Auftrennung eines Gemischs über Quadrupole die Konzentration eines Immunsuppressivums über dessen spezifische Masse detektieren und berechnen. Die vorgeschaltete HPLC fungiert dabei mit seinen verschiedenen Pumpen als Probengeber mit Vorfilterfunktion für die MS/MS.

Die LC-MS/MS wird seit Anfang des 21. Jahrhunderts, nicht nur für das TDM der Immunsuppressiva, zunehmend wichtiger. Sie kann mit ihrer höheren Spezifität und Sensitivität gegenüber den Immunoassays und HPLCs, die Substanz-Spiegel der Patienten exakter wiedergeben [54, 56, 83]. Zusätzlich ergibt sich durch die LC-MS/MS die Möglichkeit Substanzen zu messen, für die zuvor keine spezifischen Antikörper für Immunoassays hergestellt werden konnten [84].

In den allermeisten Veröffentlichungen wird die LC-MS/MS als Methode für das TDM der Immunsuppressiva gelobt oder in Gegenüberstellung mit den Immunoassays empfohlen (eine kleine Auswahl: [64, 77, 78, 80, 83, 85-87]). Die herausstechenden Vorteile sind die breite Anwendbarkeit, die Flexibilität (neue Assays für andere Medikamente lassen sich einfach etablieren) und, dass innerhalb eines Durchgangs eine Probe auf mehrere Substanzen untersucht werden kann [49, 85, 88]. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in den letzten Jahren immer mehr Immunsuppressiva in Kombination gegeben werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren [33, 89]. Güssregen [54] beschreibt außerdem weitere Vorteile der LC-MS/MS gegenüber einer herkömmlichen HPLC. Diese sei durch weniger Probenvorbereitung, einer kürzeren Analysezeit und der entfallenden Veränderung der zu messenden Substanz, um diese messen zu können (Derivatisierung), gekennzeichnet. Die Vorteile gegenüber der schon länger bestehenden Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) seien ebenfalls die kürzere Analysezeit und die entfallene Derivatisierung, aber auch, dass man mit Hilfe der LC-MS/MS auch Moleküle mit größerer Masse messen könne [54].

Die zunächst selbst hergestellten Assays für die LC-MS/MS waren insofern nachteilig, dass die Herstellung durch heterogene Geräte verschiedener Laboratorien erfolgte [90] und somit in Ringversuchen zu Differenzen führte [87]. Die kommerziellen Immunsuppressiva Kits würden die LC-MS/MS besser zugänglich für die Routinemessungen in Laboren machen und könnten für eine bessere Inter-Labor-Reproduzierbarkeit sorgen, so Polledri und Vogeser [78, 85]. Auch die Studie von Pohanka et al. von 2016 würde weitere Abstimmungen zwischen Laboren zu diesem Zwecke begrüßen [75].

Nun ist durch das kommerzielle Kit auch die Verwendung von internem Standard möglich [79], welcher für die Genauigkeit der Messungen unabdingbar ist. Der interne Standard kann die Ionensuppression, den Matrixeffekt und weitere Störeffekte ausgleichen [49, 54, 74, 83].

Dies führt zu den Nachteilen einer LC-MS/MS. Ein sehr wichtiger Punkt ist die Ionensuppression. Diese beschreibt einen Vorgang, bei dem an der Ionenquelle die Moleküle nicht ausreichend ionisiert werden [49, 85]. Ohne Ionisierung gelangen die Moleküle nicht in den Analysator. Der interne Standard wird jedoch, da er dem Analyten sehr ähnlich ist, vergleichbar ionisiert. Das Verhältnis von Analyt und internem Standard bleibt gleich, sodass das Ergebnis nicht verfälscht wird. Um dies zu gewährleisten, bedarf es jedoch regelmäßiger Wartungen und Qualitätskontrollen [64, 85].

Auch für die Sicherstellung der Peak-Intensitäten sind Qualitätskontrollen der LC-MS/MS unabdingbar. Ungenügende Peak-Intensitäten können viele Ursachen haben: Von simplen Verunreinigungen, über nachlassende Qualität der Säulen, bis hin zu falschen Angaben der Massenübergänge. Die Messergebnisse werden hierdurch ungenauer.

Der Matrixeffekt ist ein weiterer im Zusammenhang mit der LC-MS/MS beschriebener negativer Aspekt. Störende Moleküle in der Probe können Probleme bei der Ionisierung erzeugen, wodurch es zu einer Ionensuppression oder Expansion der Ionisierung kommen kann [84]. Von den beiden Ionisationsmethoden unter atmosphärischen Druck, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* und ESI, ist die ESI diejenige, die anfälliger für den Effekt ist [64]. Auch hier kann ein gut ausgerichteter interner Standard behilflich zur Reduzierung des Effektes sein, da dieser ähnlich betroffen ist wie die zu messende Substanz [74, 83].

53

5.1.4. Immunoassay

Die Immunoassays für die Bestimmung von Immunsuppressiva-Spiegel im Vollblut sind Sandwich-Assays. Nach mehreren Arbeitsschritten sind die Immunsuppressiva an Antikörper gebunden, dessen Chemilumineszenz gemessen werden kann [69, 70].

Von Vorteil ist, dass die Immunoassays im Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf in eine Labor-Straße integriert sind. Nach manueller Aufarbeitung muss man die Proben nur noch auf die Straße stellen und nach ca. 18 Minuten erhält man ein Ergebnis. Leung et.al beschreibt die Immunoassays, durch minimale Probenvorbereitung und schnelle *turn-around-Zeiten*, als einfach zu handhaben [84].

Ein großer Nachteil der Immunoassays ist, neben der manuellen Aufbereitung, dass sie auch inaktive Teile der Ursprungssubstanz (Metaboliten) der Immunsuppressiva mitmessen [53] und damit deutlich höhere Ergebnisse erhalten als andere Methoden. Bis zu 30% des gemessenen Spiegels kann durch die nicht-spezifische Messung von Metaboliten verantwortet sein [91].

Weitere Nachteile der Immunoassays sind Kreuzreaktionen der Assay-Antikörper und Über- und Unterschätzung des Immunsuppressiva-Spiegels durch Schwankungen im Hämatokrit-Wert [49]. Beispielsweise kann ein hoher Titer an Rheuma-Faktoren die Immunoassays beeinflussen und so zu einem falsch hohen TAC-Wert führen. Ebenso führt ein zu niedriger Hämatokrit-Wert von kleiner 30% zu einem zu hohen Wert [92, 93]. Sollten nun die Medikamente auf Grund eines falsch hohen Wertes verringert oder abgesetzt werden, könnte dies weitreichende Folgen für den Patienten haben.

5.1.5. Evaluierung

Für den erfolgreichen Abschluss der Evaluierung mussten die Serienpräzision, die Tag-zu-Tag-Präzision, die Linearität und der Patientenvergleich durchgeführt werden.

Die Präzisionen wurden mittels selbst hergestellter Lösungen oder den Kontrollen und Kalibratoren des Herstellers durchgeführt. Dabei war für das niedrigste Level kein Zielwert kleiner als 2 µg/l für TAC, SIR und Eve und als 33 µg/l für CSA gewählt worden. In anderen Studien nutzte man Level, die nochmals tiefer gehen, worauf diese jedoch schlechtere CVs für ihre Präzisionen erhielten [79, 94, 95]. Fraglich ist daher, wie sinnvoll eine Evaluierung in solch tiefen Leveln ist, wenn der Blutspiegel für CSA nicht unter 100 µg/l und für TAC, SIR und Eve nicht unter 3 µg/l liegen sollte. Für CSA lag der höchste Zielwert dieser Studie bei 1137 µg/l. Damit war er etwas höher als in anderen Studien und es konnte dennoch ein guter CV erreicht werden. Jedoch befindet sich auch dieser Wert außerhalb des therapeutischen Bereichs und könnte damit weniger klinische Relevanz aufweisen.

Der Patientenvergleich lag mit der reinen Probenanzahl etwa im unteren Mittelfeld. Der Patientenvergleich für SIR hätte mehr Proben enthalten können, wofür man jedoch noch weitere Proben selbst herstellen oder vom Fremdlabor hätte bestellen müssen. Da die Ergebnisse signifikant waren und die LC-MS/MS schnell und kostengünstig etabliert werden sollte, entschied man sich dagegen. Zusätzlich kann man von einem Publikations-Bias ausgehen, wobei kleinere Studien vermutlich seltener veröffentlicht werden.

Die Linearität der LC-MS/MS wurde anhand der Messung von 11 selbst hergestellten Leveln bestätigt. Zuvor wurde ein Versuch der Linearität mittels der sechs Kalibratoren des Herstellers gestartet, ähnlich wie bei einer anderen Studie von 2016 [75]. Es erschien sinnvoll die Linearität, mit mehr als nur sechs Leveln und mit einem gleichmäßigeren Abstand der Level, vor allem im therapeutischen Bereich, erneut durchzuführen. Der Patienten-Pool 3 wurde dafür 10-mal verdünnt. Pablo et. al verdünnten ebenfalls für den Linearitätsbeweis von einem hohen Level runter; hier vom höchsten Kalibrator des Herstellers [96].

Es wurde keine Bestimmung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenze mehr durchgeführt, andere Studien hielten dies jedoch für zweckmäßig [78, 96, 97].

5.1.6. Methodenvergleich

Der Methodenvergleich untergliederte sich in den Teil des Patientenvergleichs, in dem die Immunoassays mit der LC-MS/MS verglichen wurden, in die Patientenverfolgung, die Testverfügbarkeit bzw. Zeitinanspruchnahme und in die Wirtschaftlichkeit.

Die Patientenverfolgung wurde an zwei Patienten nach Herztransplantation über vier Wochen durchgeführt. Sicherlich spannend wäre eine Verfolgung der Patienten über das erste Jahr nach Transplantation hinweg gewesen. Dies hätte jedoch den Rahmen dieser Studie überschritten und wäre im Zentrallabor des UKDs nicht vollends möglich, wenn die Routinediagnostik auf die LC-MS/MS umgestellt wurde und es somit keinen Betrieb mehr für die Immunoassays gibt. Außerdem war die Verfolgung auf TAC beschränkt, eine Verfolgung für SIR und EVE hätte sich angesichts der sinkenden Verschreibungen sicherlich schwieriger gestaltet. Die meisten anderen Studien beschäftigten sich, wenn auf bestimmte Patienten bezogen, mit dem Unterschied zwischen LC-MS/MS und Immunoassay, die Frage nach einer veränderten Dosierung der Immunsuppressiva blieb jedoch oft unbeantwortet [91].

Die *turn-around*-Zeit wurde mittels Probelaufzeitmarken bestimmt. Die *hands-on*-Zeit wurde jedoch von den Mitarbeitern selbst gemessen. Hierbei könnten Ungenauigkeiten bei den Aufzeichnungen durch Zeitdruck oder Vergessen des Zeitnehmens entstanden sein, was eine Schwäche dieser Berechnung sein könnte.

Die Kostendifferenz der Methoden wurde intern genauestens berechnet, von einer Offenlegung der einzelnen Preise wird jedoch abgesehen. Die Berechnung des Zeitaufwandes beruht auf Herstellerangaben, der klinischen Erfahrung mit den Methoden

und den Personalbindungskosten und kann daher von Labor zu Labor variieren. Diese Punkte könnten eine weitere Schwäche der Studie sein.

5.1.7. Statistik

Für die Tag-zu-Tag- und Serienpräzisionen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test in Excel auf Normalverteilung geprüft und MW, MD, SD, CV etc. berechnet. Dabei sollte man sich vor Augen führen, dass der MW von Ausreißern beeinflusst wird und daher wichtig für den CV ist und der MD eher ein Mittelmaß für die Ergebnisse der Messungen darstellt. Der CV wird international zum Vergleich der Präzisionen verwendet.

Beim Patientenvergleich fand die Prüfung mithilfe der Deming-Regression auf Korrelation statt und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand von Differenzenplots. Die Deming-Regression ist, genauso wie der Differenzenplot, eine gängige statistische Praktik im Vergleich zweier Methoden. Eine gleichwertige Alternative wäre die Passing-Bablok-Regression gewesen. Da jedoch internationale Studien häufig auf die Deming-Regression zurückgriffen (bspw. [90, 96, 98]), lag die Entscheidung, zwecks besserer Vergleichbarkeit, bei dieser Art der Regression.

Die Linearitätsberechnungen fanden mittels Linearitätstest nach Mandel und der graphischen Darstellung mit Ziel- und Abweichungsgeraden von 10% statt. Pablo et al. ließen ebenfalls systemische Fehler bis 10% zu [96]. Andere Publikationen griffen bei der Auswertung auf die polynomiale Regression [90], die Regression der jeweiligen Software [99] oder die lineare Regression mit $1/x$ -Gewichtung [95] zurück. Den Korrelationskoeffizienten R^2 verwendeten ebenfalls einige Studien [77, 97, 99]. Es scheint kein Merkmal von besonderer oder fehlender Qualität zu sein, welche Auswertungsmethode verwendet wird, eher liegt ein Belieben des Auswerters vor.

56

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Evaluierung

Die Evaluierung konnte bei den beiden Präzisionen stets mit einem CV unter 9% abgeschlossen werden, meist waren die CVs sogar deutlich darunter. Für die Serienpräzisionen ($n=3$ je Immunsuppressivum) konnten sehr gute Ergebnisse, bei CVs von $< 7,5\%$, für alle Serien erreicht werden. Neun der insgesamt 12 Serien blieben sogar $< 6\%$. Die Tag-zu-Tag-Präzisionen ($n=5$ je Immunsuppressivum) erzielten etwas

schlechtere Ergebnisse als die Serienpräzisionen. 17 der insgesamt 20 Präzisionen blieben bei einem $CV < 8\%$.

Die Serien- und Tag-zu-Tag-Präzisionen lassen sich nicht exakt mit anderen Studien vergleichen. Jede Studie verwendet andere Analytkonzentrationen oder eine andere Anzahl an Proben für die Durchführung, sodass man bspw. auch eine Studie mit einer Serienpräzision von nur fünf Werten [95] in der Literatur findet. So sollte man bei deutlich besseren oder auch schlechteren Ergebnissen anderer Studien darauf achten, dass die Bedingungen für die Präzisionen vergleichbar sind. Bei der Entwicklung eines eigenen Assays zur Immunsuppressiva-Spiegelmessung in Hannover erhielten die Entwickler deutlich bessere CVs für fast alle der einzelnen Präzisionen. Die Prüfung der Präzisionen dieses Assays fiel jedoch deutlich weniger umfangreich aus als die Prüfung in dieser Studie [99]. Eine vergleichbare Studie aus der Türkei [97] berichtete bei ähnlichen Konditionen von besseren CVs, ebenso eine Studie aus Freiburg für die CVs der Tag-zu-Tag-Präzision [95].

Auch hierbei wird man von einem Publikationsbias ausgehen können, sodass sich vermuten lässt, dass die Messungen dieser Studie etwa im Mittelfeld der CVs für die Präzisionen im Vergleich zu anderen Studien liegen. Die weitere Literaturrecherche ergab, dass die Ergebnisse dieser Studie für den niedrigen Wertebereich oft besser waren als bei vergleichweisen Studien. Im hohen Wertebereich lagen die CVs überdies etwas höher [53, 76, 86, 94], auch in Gegenüberstellung mit den Verifizierungsdaten des Herstellers [55]. Im Vergleich zu einer neuen Evaluierung aus 2020 waren die Daten dieser Studie sogar deutlich besser [96]. Außerdem gab es bei Präzisionen keine Ausreißer der CVs nach oben.

Bei den Patientenvergleichen ist man sich einig, dass für einen Vergleich von Immunoassays zu LC-MS/MS die Werte für die Immunsuppressiva-Spiegel im Schnitt niedriger liegen. Für die Ergebnisse des Patientenvergleichs dieser Studie gilt, dass die Spiegel für CSA im Mittel 9,4% niedriger und für TAC 10,6% niedriger liegen. Ähnlich fielen die Ergebnisse der, oben schon genannten, großen Studie aus Korea aus. Diese erhielten 14% niedrigere Werte für TAC und 18% niedrigere für CSA [77]. Ein anderer Vergleich von 2013 zeigte sogar eine Abweichung von 27,8% für TAC und 30,3% für CSA [76]. Ältere Vergleiche wiesen ebenfalls Abweichungen von 15-30% für beide Immunsuppressiva auf [80, 91, 98].

Bei den Patientenvergleichen für CSA und TAC, die die LC-MS/MS untereinander verglichen, wurde festgestellt, dass aktuell die Werte der LC-MS/MS des

Universitätsklinikums Düsseldorf etwas unter denen des Fremdlabors liegen. Dass sich für CSA hohe Spiegel >250 g/l schwieriger vergleichen lassen, wurde auch schon 2013 in einer Methodenevaluierung des Kits [79] festgestellt. Grund hierfür könnten verschiedene Kalibrator-Sätze sein. Es ist nicht überraschend, dass sich die Ergebnisse signifikant unterscheiden, da zwar derselbe maschinelle Aufbau (LC-MS/MS mit ESI und Triplequadrupol) verwendet wird, jedoch das Fremdlabor einen *in-house*-Assay benutzt während das Zentrallabor des UKDs ein Immunsuppressiva Kit evaluiert. Auch Napoli et al. beschrieben 2010 in einer Multicenter Studie, dass es zwischen den zu validierenden kommerziellen Kits und den *in-house* Methoden Abweichungen gibt [90]. Dennoch zeigt die Deming-Regression für alle Immunsuppressiva eine Steigung $>0,89$ und der Pearson's r sogar für alle $>0,9$, was auf eine sehr gute Korrelation schließen lässt, ob beim Vergleich mit den Immunoassays oder mit der LC-MS/MS des Fremdlabors. Die Linearität wies für alle Immunsuppressiva einen R^2 von $>0,994$ auf. Damit entspricht sie den allgemeinen Standards.

5.2.2. Methodenvergleich

Die Patientenverfolgung ergab, dass bei etwa gleichbleibenden Zielwerten für die TAC-Blutspiegel, die Patienten, laut behandelndem Oberarzt, in Zukunft vermutlich etwas mehr von dem jeweiligen Medikament erhalten werden. Untersucht wurden hier die TAC-Spiegel von zwei Patienten. Was wiederum für die anderen drei Immunsuppressiva gilt, ist noch nicht untersucht und könnte in einer größeren Patientenverfolgung analysiert werden. Eine größere Studie aus 2002, die die TAC-Spiegel nach Leber- und Nierentransplantation beobachtete, kam ebenfalls zu dem Schluss, dass die Dosis angepasst und weitere Nachforschungen dazu angestellt werden müssten [91]. Eine große, valide Studie über die genaue Anpassung der Dosen nach Umstellung von Immunoassays auf LC-MS/MS konnte nicht gefunden werden. Vermutlich ist es zu unpräzise eine allgemeine Aussage über die Veränderungen der Dosen für die Immunsuppressiva zu tätigen. Pohanka et al. [75] vermutete sogar eine Gefahr für die Patientensicherheit. Die Einschätzung des Klinikers über die Dosis und die klinische Zusammenschau und Kondition des Patienten wird auch in Zukunft nicht an Bedeutung verlieren. Auf eine gute Zusammenarbeit zwischen Klinikern und dem Labor wurde schon in Vergangenheit großen Wert gelegt [75].

Die Berechnungen zur Wirtschaftlichkeit ergaben, dass sich die Anschaffung der LC-MS/MS aufgrund der wesentlich niedrigeren Preis-pro-Proben-Kosten definitiv lohnt.

Diese Berechnung ist jedoch an die Konditionen des Universitätsklinikums in Düsseldorf gebunden und kann nicht auf andere Labore mit anderen Verträgen oder Herstellern übertragen werden. Eine Studie aus Kanada berichtete über eine Kosteneffizienz nach weniger als drei Jahren. Diese evaluierten jedoch auch direkt zwei LC-MS/MS [98]. Alle im Literaturverzeichnis zu findende Studien, die über die Kosten berichten, zeigen auf, dass die Anschaffungskosten zwar sehr hoch sind, sich die LC-MS/MS dennoch aufgrund der deutlich niedrigeren laufenden Materialkosten lohnt (bspw. [54, 77, 95]).

Insgesamt ist die *turn-around*-Zeit für CSA und TAC höher. Vor allem zu Beginn der Routinediagnostik, wenn die Mitarbeiter noch in die neue Methode eingearbeitet werden, zieht sich der *turn-around* in die Länge. Eine Studie berichtete sogar von verärgerten Klinikern, die länger auf die Ergebnisse der Immunsuppressiva-Spiegel warten mussten [75]. Als Gegenargument dazu wurde bei den Ergebnissen die verringerte *hands-on*-Zeit bei der LC-MS/MS gegenüber den Immunoassays registriert. In den allermeisten Fällen sind Kontrollen der Immunsuppressiva-Spiegel keine Notfalllabore, sodass der Zeitgewinn im Labor den Zeitverlust der Kliniker überwiegen sollte. So sprachen auch Buchwald et al. von einer Zeitersparnis durch die Möglichkeit einer gleichzeitigen Messung mehrerer Analyten [95] und Hetu et. al von einem besseren Probendurchsatz [98]. Trotzdem gingen Leung et al. soweit zu sagen, dass bei TDM und entsprechend schnell erforderlichen Ergebnissen, die Immunoassays geeigneter sein könnten [84]. Auch eine weitere Studie von Pohanka et al. [75] befürchtete eine starke Erhöhung der *turn-around*-Zeit bei Umstellung auf die LC-MS/MS. Diese konnte jedoch zeigen, dass über einige Jahre hinweg die Zeiten nochmals verbessert werden konnten.

Durch die bei der LC-MS/MS stets mitlaufenden Kalibratoren und Kontrollen, müssen für diese keine extra Durchgänge angesetzt werden. Das ist ein großer Vorteil der LC-MS/MS gegenüber den Immunoassays. Bei Problemen, wie zum Beispiel einer Kontrolle außerhalb des akzeptablen Referenzbereiches, werden evtl. Wiederholungen großer Durchgänge nötig. Dies würde für diesen Tag Einbußen in Bezug auf die Zeitersparnis und Kosteneffizienz bedeuten. Natürlich könnten solche Hürden auch bei den Immunoassays auftreten, doch da hier nur Sätze bis zu 15 Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden, erscheint der Verlust geringer.

Ein Nachteil der LC-MS/MS gegenüber den Immunoassays ist derzeit das weniger intuitive und komplizierte Handling in Bezug auf Gerät und Software. Ein Bericht von Vogeser et al. zeigte dies ebenfalls auf [85] und auch andere Studien setzten auf entsprechend (hoch)qualifiziertes wissenschaftliches Personal [84, 100].

5.3. Ausblick

Durch Robustheit, Kontinuität und Genauigkeit, sowie geringere *hands-on*-Zeit und bessere Kosteneffektivität wird die Routineuntersuchung der Immunsuppressiva mit der LC-MS/MS den klinischen Alltag im Labor und auf Station voraussichtlich zum Positiven verbessern.

In nachfolgenden Untersuchungen könnte man sich auf die Auswirkungen der Methodenumstellung fokussieren. Da sich die Referenzbereiche für die Immunsuppressiva nur unerheblich geändert haben, werden Patienten vermutlich demnächst im Schnitt mehr Immunsuppressiva (bezogen auf CSA und TAC) erhalten. Dies könnte man mit Hilfe einer retrospektiven Studie untersuchen, zusammen mit der Frage, ob sich die Erhöhung der Medikamente auf die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen oder Nebenwirkungen auswirkt.

Im Patientenvergleich wurde deutlich, dass mit dem aktuellen Kalibrator-Satz die Spiegel-Messungen für CSA und TAC etwas unter denen des Fremdlabors liegen. Hier könnte man weitere Messreihen veranlassen. Interessant wäre aber auch Nachforschungen anzustellen, inwieweit sich die Messungen von den Immunoassays denen der LC-MS/MS des Fremdlabors annähern. Dies ist in dieser Studie nicht untersucht worden.

Die Massenspektrometrie ist momentan die führende Methode zur Untersuchung von Immunsuppressiva-Spiegeln. Gibt es jedoch zwischen den verschiedenen Arten der Massenspektrometer Unterschiede? Dies könnte man in weiteren Analysen herausfinden. Zusätzlich wäre ein Vergleich von Qualität, Wirtschaftlichkeit und Zeitmanagement zwischen einer LC-MS/MS und einer Laborstraße mit integrierter LC-MS/MS von Interesse.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht einiger Immunsuppressiva und deren Zulassungen.....	3
Tabelle 2: Massen und Massenübergänge der Immunsuppressiva	18
Tabelle 3: Massenübergänge 2 für die weitere Kontrolle der Messungen.....	18
Tabelle 4: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für CSA zu Beginn und zur Erhaltungstherapie	19
Tabelle 5: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für TAC zu Beginn und zur Erhaltungstherapie	19
Tabelle 6: Therapeutische Bereiche der Blutkonzentration für SIR	19
Tabelle 7: Minimaler Bereich der Blutkonzentration für EVE.....	20
Tabelle 8: CVs der Serienpräzisionen für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges).....	27
Tabelle 9: CSA-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)	28
Tabelle 10: TAC -Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)	28
Tabelle 11: SIR-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)	29
Tabelle 12: EVE-Ergebnisse der Serienpräzision (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)	29
Tabelle 13: CVs der Tag-zu-Tag-Präzision für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen).....	30
Tabelle 14: CSA-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)	31
Tabelle 15: TAC-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)	31
Tabelle 16: SIR-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)	32
Tabelle 17: EVE-Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Präzision (20 Messungen innerhalb von höchstens 23 Tagen)	32
Tabelle 18: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 103 CSA-Proben (gemessen mit LC-MS/MS und Immunoassay).....	34

Tabelle 19: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 152 TAC-Proben (gemessen mit LC-MS/MS und Immunoassay).....	35
Tabelle 20: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 19 CSA-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)	36
Tabelle 21: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 19 TAC-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)	37
Tabelle 22: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 34 SIR-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)	38
Tabelle 23: Ergebnisse des Patientenvergleichs mit 98 EVE-Proben (gemessen mit LC-MS/MS Fremdversand und LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD)	39
Tabelle 24: 18 Messungen des TAC-Spiegels mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay über 3½ Wochen von Patient 3 im Zuge der Patientenverfolgung.....	44
Tabelle 25: 18 Messungen des TAC-Spiegels mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay über 3½ Wochen von Patient 4 im Zuge der Patientenverfolgung.....	45
Tabelle 26: Vergleich der hands-on-Zeit für die beiden verwendeten Methoden im Zeitraum von Februar bis Mai 2021(LC-MS/MS)	47
Tabelle 27: Vergleich der turn-around-Zeiten der drei verwendeten Methoden im Zeitraum vom 01.02.-31.03.2020 (Immunoassays und Fremdversand) und 01.02.-31.03.2021 (LC-MS/MS)	48
Tabelle 28: Manual für die Benutzung des Pipettierroboters und der Analyst-Software.....	66
Tabelle 29: Zielwerte und Referenzbereiche für die Kontrollen 1-4 für CSA, TAC, SIR und EVE des MassTox®-Immunsuppressiva-Kits	71
Tabelle 30: Zielwerte für die zwei in der Studie verwendeten LOT-Nummern der Kalibratoren 0-6 für CSA, TAC, SIR und EVE des MassTox®-Immunsuppressiva-Kits	72
Tabelle 31: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von CSA	76
Tabelle 32: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von TAC	77
Tabelle 33: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von SIR.....	77
Tabelle 34: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von EVE	78

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eingriff von CSA und TAC in die intrazelluläre Signalkaskade durch Hemmung von Calcineurin und daraus resultierender Inhibierung der T-Zell-Aktivierung	4
Abbildung 2: Eingriff von Rapamycin in die intrazelluläre Signalkaskade über Hemmung von mTOR und daraus resultierender Arrest der Zelle in der G1-Phase und S-Phase	7
Abbildung 3: Übersicht Zellzyklus bei Eukaryoten	7
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der therapeutischen Breite eines Arzneistoffes.....	8
Abbildung 5: Aufbau einer HPLC.....	13
Abbildung 6: Schematischer Aufbau einer ESI.....	15
Abbildung 7: Skizze eines Quadrupols mit Ionenstrahl und zwei verschiedenen Flugbahnen der Ionen	15
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Tandem-MS	16
Abbildung 9: Bildliche Darstellung der CVs der Serienpräzisionen für CSA, TAC, SIR und EVE (20 Messungen innerhalb eines Messdurchganges)	27
Abbildung 10: Bildliche Darstellung der CVs in Prozent der Tag-zu-Tag-Präzision für CSA, TAC, SIR und EVE.....	30
Abbildung 11: Vergleich von CSA-Spiegeln gemessen in 103 Proben mit Immunoassay (Abszisse) und LC-MS/MS (Ordinate)	34
Abbildung 12: Vergleich von TAC-Spiegeln gemessen in 152 Proben mit Immunoassay (Abszisse) und LC-MS/MS (Ordinate)	35
Abbildung 13: Vergleich von CSA-Spiegeln gemessen in 19 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD(Ordinate)	36
Abbildung 14: Vergleich von TAC-Spiegeln gemessen in 19 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate)	37
Abbildung 15: Vergleich von SIR-Spiegeln gemessen in 34 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate)	38

Abbildung 16: Vergleich von EVE-Spiegeln gemessen in 98 Proben mit der LC-MS/MS des Fremdversandes (Abszisse) und der LC-MS/MS des Zentrallabors des UKD (Ordinate)	39
Abbildung 17: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für CSA (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen).....	41
Abbildung 18: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für TAC (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen).....	41
Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für SIR (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen)	42
Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der Linearität für EVE (gemessen wurden die 11 Level auf der LC-MS/MS (Ordinate) und gegen dessen Zielwerte (Abszisse) aufgetragen).....	42
Abbildung 21: Verlauf des TAC-Spiegels (gemessen mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay) über 3 ½ Wochen von Patient 3 im Zuge der Patientenverfolgung.....	44
Abbildung 22: Verlauf des TAC-Spiegels (gemessen mit der LC-MS/MS und dem Immunoassay) über 3 ½ Wochen von Patient 4 im Zuge der Patientenverfolgung.....	45
Abbildung 23: Boxplot der hands-on-Zeit für die LC-MS/MS im Zeitraum von Februar bis Mai 2021	47
Abbildung 24: Boxplots der turn-around-Zeiten für die drei verwendeten Methoden im Zeitraum vom 01.02.-31.03.2020 (Immunoassays und LC-MS/MS des Fremdversands) und 01.02.-31.03.2021 (LC-MS/MS UKD).....	48
Abbildung 25: Differenzenplot des Patientenvergleich für CSA: Gemessen wurden 103 Patientenproben auf dem Immunoassay und der LC-MS/MS.....	73
Abbildung 26: Differenzenplot des Patientenvergleich für TAC: Gemessen wurden 152 Patientenproben auf dem Immunoassay und der LC-MS/MS.....	73
Abbildung 27: Differenzenplot des Patientenvergleich für CSA: Gemessen wurden 19 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes	74

Abbildung 28: Differenzenplot des Patientenvergleich für TAC: Gemessen wurden 19 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes 74

Abbildung 29: Differenzenplot des Patientenvergleich für SIR: Gemessen wurden 34 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes 75

Abbildung 30: Differenzenplot des Patientenvergleich für EVE: Gemessen wurden 98 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes 75

7. Anhang

7.1. Hilfe für Hamilton-Pipettierroboter und Analyst

Tabelle 28: Manual für die Benutzung des Pipettierroboters und der Analyst-Software

Aufgabe	Weitere Erklärung
1 An der HPLC den Knopf „Oven“ drücken	Der Ofen kann schon vorheizen, solange man am Pipettierroboter ist (Dauer ca. 5-10 min.)
Pipettierroboter	
2 Reihe 1-3 mit Proben, Kontrollen, Kalibratoren, Internen Standard, Extraction Buffer, Precipitation Reagent und Wasser nach Beschriftung auffüllen	Für genaue Lage siehe Seite 15 der Arbeitseinweisung Hamilton Rack/Reihe 1 ganz hinten die 7 Kalibratoren, davor die 4 Kontrollen, davor leere Reihen, ganz vorne in der ersten Spalte der interne Standard Rack 2 wie beschriftet auffüllen (Wasser ist normales Leitungswasser), davor Precipitation Reagent und davor Extraction Buffer Bei Beladen der Proben darauf achten, dass der Barcode durch die Öffnung zu sehen ist (Rack 3)
3 Ab Reihe 12 beladen des Roboters mit Pipettenspitzen, Filterplatten und Auffangplatten	Die Pipettenspitzen, die Filter- und Auffangplatte müssen nicht bei jedem Durchgang frische Platten sein Beide dürfen jedoch nicht mehr als 10 benutzte Reihen haben. Filterplatten sind die ersten drei Platten des linken Carriers Auffangplatten sind die ersten drei Platten des rechten Carriers Die Pipettenspitzen sind jeweils die letzten zwei Platten der Carrier
4 Am befestigten Abschnitt überprüfen, dass eine Filterplatte auf der hinteren Position und drei Auffangplatten auf der mittleren Position liegen	Die Auffangplatten sind hier als „Gegengewicht“ gekennzeichnet Sollte eine der Auffangplatten auf der vorderen Position liegen, diese kurz Ausschütten (meist befindet sich hier noch etwas Wasser darin) und auf die anderen beiden Auffangplatten zurücksetzen
5 Nun die Software starten, auf das Start Symbol oben links klicken und die Methode Immunsuppressiva auswählen	„MassToxImmunsuppressiva“ ist momentan die einzige Methode, das Gerät kann noch auf andere Substanz-Messungen erweitert werden.
6 Es wird das Fenster „Run Parameters“ automatisch	Bsp.: User-Name: Zentrallabor Number of Samples: 10

	geöffnet, hier alle Angaben ausfüllen und „ok“ klicken	<p>„The first column with unused wells“ (hier ist die Filterplatte gemeint, die eventuell nicht frisch ausgetauscht wurde, einfach abzählen ab welcher Reihe/Spalte noch kein einziger Platz benutzt wurde): 7</p> <p>„The lot number of controls/calibrators“: steht auf der Verpackung der Kontrollen und Kalibratoren</p> <p>„The number of calibrators to use“: (nach dem alles oder nichts Prinzip entweder 0 oder 7; nur beim ersten Durchgang des Tages 7, sonst 0) 7</p>
7	Es öffnet sich nun das Fenster „Loading carriers“: die Werte überprüfen und „ok“ klicken	<p>Die Software hat nun berechnet wie viel der Roboter von was benötigt</p> <p>Kontrollieren ob von allem genug in den jeweiligen Vorrichtungen vorhanden ist</p>
8	Es öffnet sich das Fenster „Select Tube Types“: die richtigen Probengefäße auswählen und „ok“ klicken	<p>„Rack 1“ sind die Proben, die auf Position 3 sitzen, „Rack 2“ auf Position 4 usw., hier muss jetzt für jedes Rack ausgewählt werden, welche Gefäße benutzt werden (z.B. EDTA Monovetten oder Vacuetten)</p> <p>CAVE: auf jedem Rack darf sich nur eine Sorte an Gefäßen befinden, möchte man zwei verschiedene Sorten an Probengefäßen pipettieren lassen braucht man mehrere Racks</p> <p>Falls mehrere Racks verwendet werden, fragt das System nun wie viele Proben sich auf welchem Rack befinden: Ausfüllen und „ok“ klicken</p>
9	Es öffnet sich ein weiteres Fenster, in dem das System nachfragt, ob die Pipetten-Spitzen so aufgefüllt sind wie abgespeichert: Prüfen und „ok“ klicken	<p>Im Zweifel nachzählen, ob die Spitzen alle da sind</p> <p>Falls etwas nicht übereinstimmt, kann man mit dem Rädchen der Maus heranzoomen und mit markieren der Spitzen diese entweder ausfüllen oder löschen, je nachdem ob die Spitzen zu wenig oder zu viel sind</p>
10	Probleme werden mit Fehlermeldung angemerkt, ansonsten zeigt das System noch am Ende an wo die Ergebnis-Dateien abgespeichert worden sind	<p>Wenn Fehler beim Beladen passieren, muss man den Durchgang meist nicht unterbrechen, sondern kann neu Befüllen und dem System sagen, dass es erneut Messen kann</p> <p>Fehler beim Pipettieren und den weiteren Vorgängen führt zum Abbruch des Durchgangs</p>
11	Der Status der Proben wird angezeigt: alle Proben sollten einen grünen Punkt haben und d	<p>Falls dies nicht der Fall ist, steht der Grund der Störung dahinter</p>

	„Sample Result“ und „Finished ok“ anzeigen	
12	Übergabe der Daten an die LC-MS	Im Software-System „Configuration“ (rechts oben) auswählen, dann dort auf „Configuration Data“, nun den Durchgang auswählen und übertragen
LC-MS/MS		
13	Hardwareprofil aktivieren: „Hardware Configuration“ anklicken, dort LC und HPLC anklicken und „Activate Profile“	Andere aktiviere Profile (sieht man durch einen grünen Haken links) vorher deaktivieren unter „Deactivate Profile“
14	NUR BEI NEUEM PROJEKT: (sonst weiter bei 15) Über Tools dann Projects > „Create Project“ ein Subprojekt für den Tag anlegen (benennen!)	Ein neues Fenster öffnet sich Einstellungen müssen nicht geändert werden (aktuelles Datum kommt automatisch) „Ok“ drücken Kontrollieren, ob das richtige Projekt ausgewählt wurde
15	Eine „Batch“ anlegen	Unter „Aquire“ dann „Aquisition Batch Template Files“ öffnen Eine Datei auswählen (dies ist die eingestellte Methode) und „ok“ klicken
16	Es erscheint die Tabelle mit der voreingestellten Methode	Kontroll-, Kalibrator- und Sample-Positionen überprüfen. Außerdem Datenfilenamen, „Vial Position“ (falls notwendig) ändern (geht einfacher über „Locations“ dann das passende „Rack“ anklicken und ausfüllen) Danach „BatchFile“ unter anderem Namen speichern: „Rack Position“ ist immer 1, „Plate Position“ ist entweder 1 oder 2) Unter anderem Namen speichern: über „File“ und „Save as“
17	Oben den Reiter „Submit“ auswählen und die ganze Batch abschicken oder einzelne Proben markieren und diese submitten, dann „ok“	Vorher muss der Ofen auf 65°C komplett fertig vorgeheizt sein
18	Jetzt „Equilibrate“ klicken, dann equilibriert die LC-MS für 1-2 Min., dann auf „Ready“ gehen (jetzt muss alles grün sein)	Ist dies abgeschlossen gibt es unten rechts grüne Symbole für „Data“, „Wait“, „Ready“ und „Run“
19	„Start Sample“	Die LC-MS/MS misst (sobald man hierauf geklickt hat) und sobald fertig bekommt die Probe einen grünen Haken und ein grüner Balken erscheint

20 Auswertung

20	Unter Companion-Software „MultiQuant“ öffnen, oben links auf den Zauberstab klicken	Darauf achten, dass das richtige Projekt geöffnet ist Der Zauberstab prozessiert die Werte
21	Es wird nun „Create a result table“ geöffnet, Proben auswählen und zu „selected“ über den oberen Pfeil schieben	Es können auch verschiedene Proben von verschiedenen Vorbereitungen ausgewählt werden und sogar von verschiedenen Tagen
22	Auf „next“ klicken und die Methode über „open“ auswählen, dann auf „Finish“ gehen	Mit „Finish“ startet die Methode
23	Überprüfen und abspeichern unter „Results save“	Die Werte sollten einmal überprüft werden Rote Proben sind Proben, die nicht in die Wertung passen (z.B., weil eine Probe kein TAC enthält, auf dieses aber getestet wurde), einmal die Warnungen auf Zielwert/Peakform überprüfen Auf „Accuracy“- oder „Ion-Ratio-Signal“ achten Über die verschiedenen Symbole/ Buttons an der Leiste kann man die Ergebnisse nun modifizieren
24	„Report“ erstellen über „File“ > „Create Report“ > „Set“ > „Save“	Unter „Create Report and Save“ kann man verschiedene Dateiformen für das Abspeichern wählen also auch verschiedene Ansichten („Output“ z.B. zeigt eine Kalibrations-Kurve)

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) nach Erfahrung an der LC-MS/MS)

Sowohl für LC-MS/MS als auch für den Pipettierroboter den „daily-“ und „weekly-check“ nicht vergessen.

7.2. Herstellung der Patientenproben und der eigenen Vollblut-Kontrollen

An dieser Stelle soll ein Einblick gegeben werden, wie die Patientenproben und die eigenen Vollblut-Kontrollen hergestellt worden sind. Für die Serienpräzisionen waren die ersten eigenen Kontrollen notwendig, da eine Durchführung dieser mit den Kontrollen des Herstellers sehr kostenaufwendig gewesen wäre. Es wurden aus den Reinsubstanzen von CSA, TAC, SIR und EVE Verdünnungen mit Acetonitril hergestellt, danach jeweils

eine erste und eine zweite Verdünnung. Dabei enthielt die erste Verdünnung rechnerisch eine Konzentration von 500 ng/μl CSA und 10 ng/μl für die anderen Immunsuppressiva und die zweite Verdünnung rechnerisch 50 ng/μl CSA und 1 ng/μl für die Anderen. Für die tiefe Kontrolle benutzte man 10 μl CSA und 30 μl TAC, SIR und EVE aus der zweiten Verdünnung, für die hohe Kontrolle waren es 20 μl CSA und 30 μl der Anderen aus der ersten Verdünnung.

Am nächsten Tag wurden die Serien für die tiefe Kontrolle für TAC und SIR und für die hohe Kontrolle für CSA mit 14 ml Vollblut wiederholt. Hierbei sind 50 μl TAC und SIR aus der zweiten Verdünnung und 25 μl CSA aus der ersten Verdünnung in das Blut gemischt worden. Eine genaue Eruiierung der Zielwerte aller Serien war nicht notwendig, da es bei der Serienpräzision vor allem darum ging stabile Messungen der LC-MS/MS, innerhalb eines Tages, aufzuzeigen.

Für den Patienten-Pool 1 wurden die Proben zweier Patienten, Patient 1 und Patient 2, zusammengegeben. Dieser Pool enthielt nun CSA und TAC. Aus der zweiten Verdünnung gab man nun noch jeweils 70 μl EVE und SIR der zweiten Verdünnung diesem Gemisch hinzu. Durch diverse Mechanismen war jedoch eine exakte Bestimmung der genauen Menge, der im Vollblut nun enthaltenen Immunsuppressiva, nicht möglich. Dieser Patienten-Pool 1 konnte nach Verwendung für die Serienpräzision auch für die Tag-zu-Tag-Präzision verwendet werden

70

Der Patienten-Pool 3 entstand für den 2. Versuch der Linearität. Ein erster Versuch, mit Kontrollen und Kalibratoren durchgeführt, war zwar signifikant, deckte jedoch nicht stufenweise den Bereich ab. Der Patienten-Pool 3 war strenggenommen auch kein Patienten-Pool, da er nur aus EDTA-Vollblut bestand, dem die Immunsuppressiva hinzugegeben wurden. Der besseren Übersichtlichkeit geschuldet, wurde jedoch auf eine neue Benennung der Probe verzichtet. Zu 10 ml EDTA-Vollblut gab man 17 μl CSA und jeweils 35 μl TAC, SIR und EVE aus der 1. Verdünnung hinzu. In einer ersten Übersichtsmessung wurde für CSA eine genügend hohe Konzentration erreicht, während von TAC und SIR nochmals 8 μl und EVE 9 μl aus der 1. Verdünnung hinzugegeben wurden. Danach erfolgte die Aufarbeitung.

Der Patienten-Pool 2 sollte für weitere Werte in der Tag-Zu-Tag-Präzision verwendet werden, wurde jedoch auf Grund unzureichender Genauigkeit beim Pipettiervorgang ausgeschlossen.

7.3. Referenzbereiche der Kontrollen und Kalibratoren

Für die Kontrollen konnte während der gesamten Evaluierung die Lot-Nummer 5019 beibehalten werden, während die Kalibratoren am 14.07.2020 von der Lot-Nummer 2619 auf 1120 wechselten. Siehe Tabelle 29 und 30.

Tabelle 29: Zielwerte und Referenzbereiche für die Kontrollen 1-4 für CSA, TAC, SIR und EVE des MassTox®-Immunsuppressiva-Kits

Kontrollen 5019	Immunsuppressivum	Zielwert in µg/l	Referenzbereich in µg/l
QC1	CSA	50,3	40,2-60,3
	TAC	2,75	1,93-3,58
	SIR	2,77	1,8-3,74
	EVE	2,48	1,66-3,3
QC2	CSA	246	197-295
	TAC	7,51	5,63-9,39
	SIR	9,77	7,33-12,2
	EVE	4,58	3,21-5,59
QC3	CSA	492	394-591
	TAC	15,7	11,8-19,7
	SIR	19,2	14,4-24
	EVE	9,03	6,77-11,3
QC4	CSA	1137	910-1364
	TAC	33,2	24,9-41,5
	SIR	38,1	30,5-45,7
	EVE	30,5	24,4-36,6

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung des Beipackzettels der Kontrollen)

Für die Kalibratoren galt eine Abweichung von 80-120% als akzeptabel, bei größeren Abweichungen von 75-125% kontrollierte man die Werte und Peaks; noch größere Abweichungen galten als inakzeptabel. Es gibt sieben Kalibratoren für die Messungen mit der LC-MS/MS. Dabei ist der Kalibrator 0 ein sogenannter *Blank Calibrator*. Die Ergebnisse für die Immunsuppressiva sollten bei diesem unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Table 30: Zielwerte für die zwei in der Studie verwendeten LOT-Nummern der Kalibratoren 0-6 für CSA, TAC, SIR und EVE des MassTox®-Immunsuppressiva-Kits

Kalibratoren	Immunsuppressivum	Lot-Nummer 2619	Lot-Nummer 1120
		Zielwert	Zielwert
Kalibrator 1	CSA	23	22,8
	TAC	1,44	1,46
	SIR	2,46	2,42
	EVE	1,92	2,12
Kalibrator 2	CSA	126	124
	TAC	5,66	5,96
	SIR	6,62	6,49
	EVE	4,8	5,55
Kalibrator 3	CSA	314	296
	TAC	11,5	11,5
	SIR	12,9	12,3
	EVE	8,91	10,6
Kalibrator 4	CSA	511	499
	TAC	16,7	17,7
	SIR	19,4	19,2
	EVE	13,2	16,2
Kalibrator 5	CSA	791	782
	TAC	22,9	24,3
	SIR	28,9	28,7
	EVE	18,4	22,5
Kalibrator 6	CSA	1882	1883
	TAC	40,6	41,1
	SIR	48,9	47,6
	EVE	33,5	40,6

(Quelle: Eigene Darstellung (2020) unter Verwendung des Beipackzettels der Kalibratoren)

72

7.4. Differenzenplots der Patientenvergleiche

Im Differenzenplot wird die absolute (hier orange) und die relative (hier blaue) Differenz der LC-MS/MS des Zentrallabors vom Zielwert (Immunoassays oder LC-MS/MS Fremdlabor) veranschaulicht. Auch hier wird noch einmal deutlich, dass die Werte der LC-MS/MS deutlich unter denen der Immunoassays (siehe auch Abbildung 25 und 26),

jedoch auch teilweise unter den Werten der LC-MS/MS des Fremdlabors liegen. Dies zeigt sich an Abbildung 27-30.

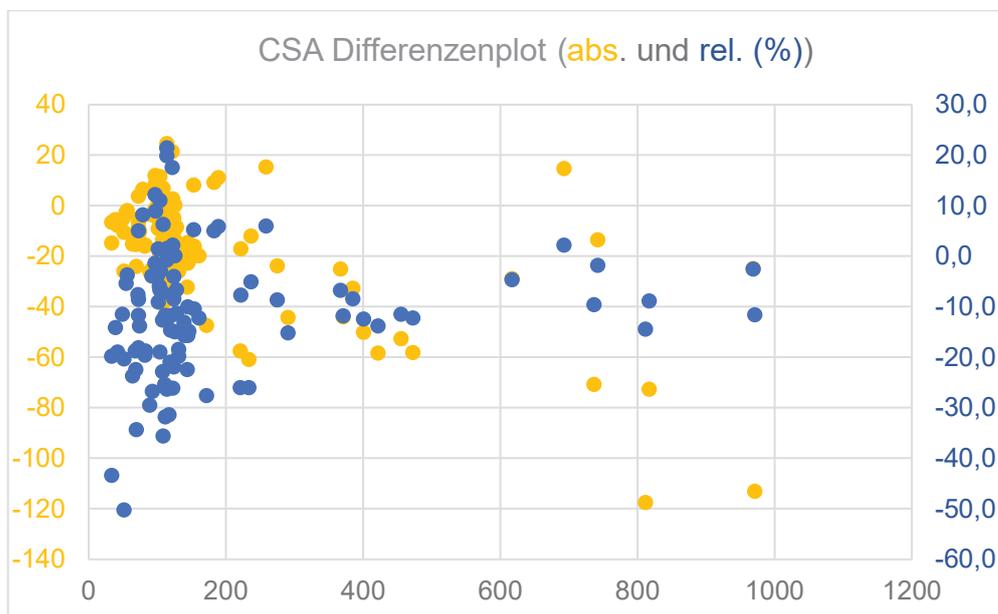


Abbildung 25: Differenzenplot des Patientenvergleich für CSA: Gemessen wurden 103 Patientenproben auf dem Immunoassay und der LC-MS/MS; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

73

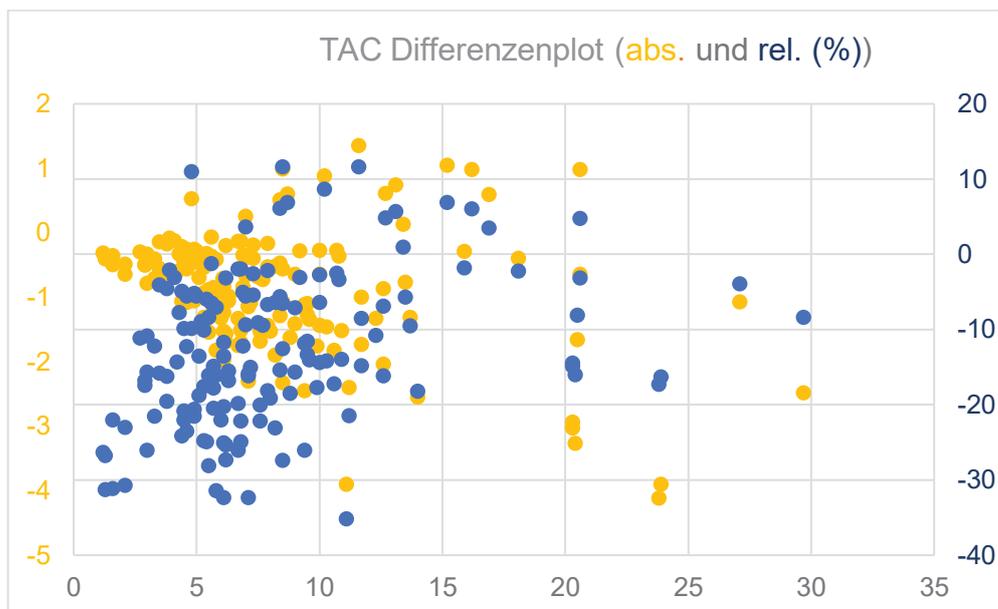


Abbildung 26: Differenzenplot des Patientenvergleich für TAC: Gemessen wurden 152 Patientenproben auf dem Immunoassay und der LC-MS/MS; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

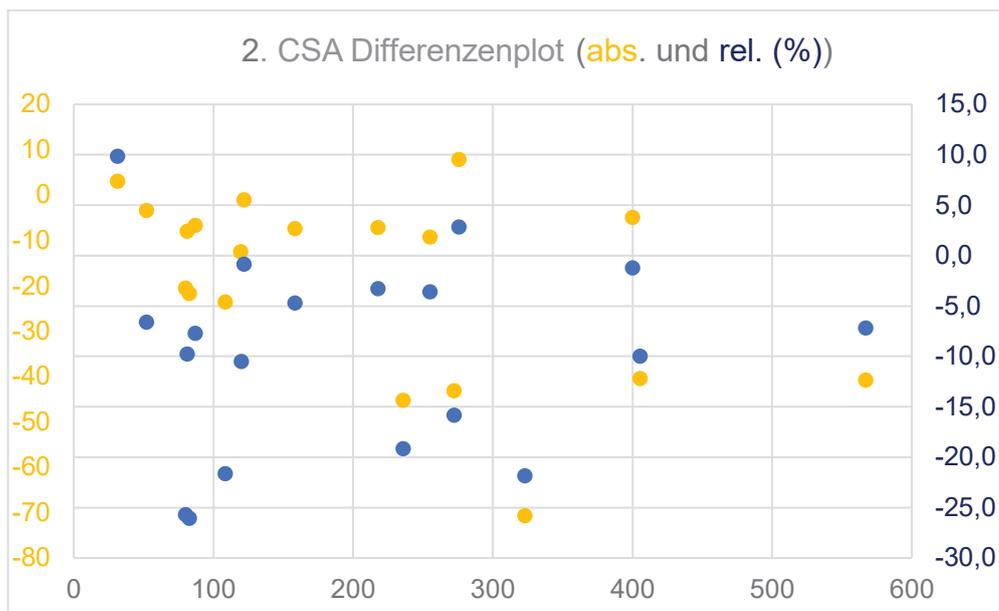


Abbildung 27: Differenzenplot des Patientenvergleich für CSA: Gemessen wurden 19 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

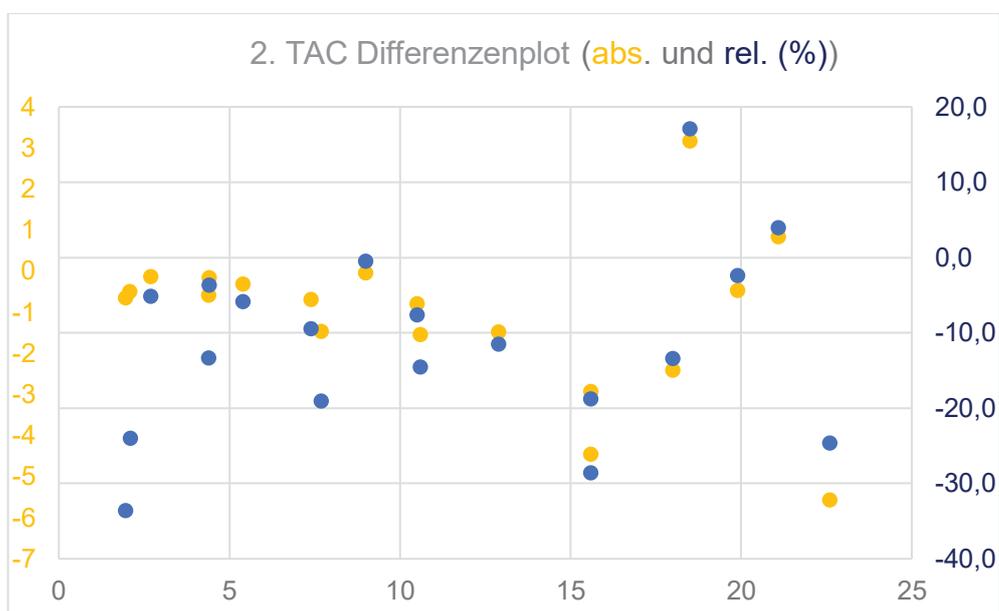


Abbildung 28: Differenzenplot des Patientenvergleich für TAC: Gemessen wurden 19 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

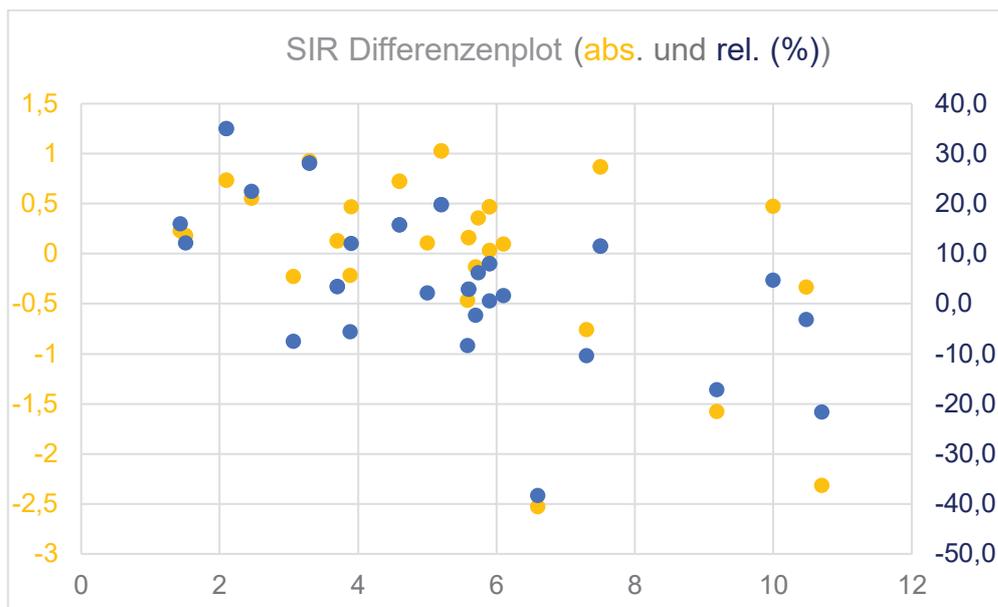


Abbildung 29: Differenzenplot des Patientenvergleich für SIR: Gemessen wurden 34 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

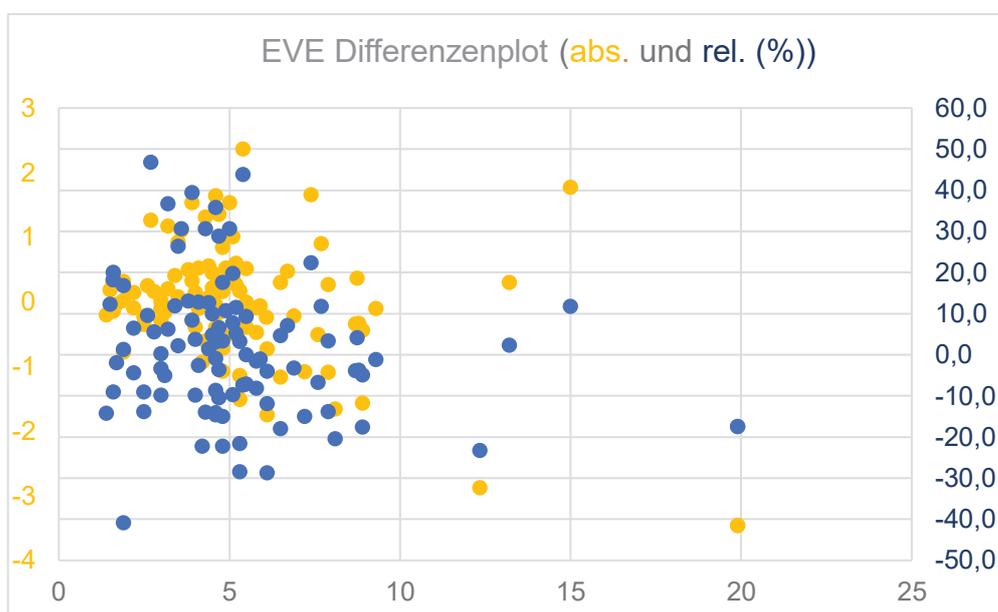


Abbildung 30: Differenzenplot des Patientenvergleich für EVE: Gemessen wurden 98 Patientenproben auf der LC-MS/MS des UKDs und der LC-MS/MS des Fremdversandes; auf der Ordinate finden sich die Differenzen (absolut und relativ) auf der Abszisse die gemessenen Werte der Proben; gelbe Punkte und gelbe Beschriftung sind die absoluten Differenzen zwischen der LC-MS/MS und dem Immunoassay in $\mu\text{g/l}$, blaue Punkte und blaue Beschriftung sind die relativen Differenzen in %

7.5. Ergebnisse und Level der Linearität

Für die Linearität wurde der Patienten-Pool 3 viermal gemessen. Aus dem MW der vier Messungen wurde der jeweilige Zielwert (Level 11) ermittelt. Das 10. Level enthielt 10% weniger des Pools; die nachfolgenden Level ebenfalls immer 10% weniger als das vorherige Level. Von Level 2 auf Level 1 wurde die Konzentration der Immunsuppressiva halbiert. Die Tabellen 31-34 zeigen die Ergebnisse der Linearität.

Table 31: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von CSA

CSA			
1.	659,572	Summe	2600,301
2.	660,931	MW/Zielwert	650,07525
3.	650,045		
4.	629,753		
Zielwerte		Lauf 1	Lauf 2
Level 11	650,07525	641,931	625,503
Level 10	585,067725	577,524	565,243
Level 9	520,0602	513,252	533,667
Level 8	455,052675	419,199	462,958
Level 7	390,04515	378,306	393,28
Level 6	325,037625	322,662	322,845
Level 5	260,0301	241,169	240,325
Level 4	195,022575	188,673	186,233
Level 3	130,01505	121,565	122,186
Level 2	65,007525	60,248	61,27
Level 1	32,5037625	29,51	28,887

Der Zielwert, entstanden aus dem MW der Messungen 1-4., diente als Level 11 und wurde für die anderen Level jeweils um 10% verdünnt, ausgenommen der 50:50 Verdünnung von Level 2 auf Level 1; alle Level wurden zweimal gemessen, alle Werte in µg/l

Tabelle 32: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von TAC

TAC			
1.	30,805	Summe	118,004
2.	29,887	MW/Zielwert	29,501
3.	28,815		
4.	28,497		
Zielwerte		Lauf 1	Lauf 2
Level 11	29,501	30,789	28,581
Level 10	26,5509	27,176	25,272
Level 9	23,6008	22,88	22,196
Level 8	20,6507	19,538	20,304
Level 7	17,7006	16,626	16,617
Level 6	14,7505	15,407	13,601
Level 5	11,8004	11,394	11,156
Level 4	8,8503	8,34	8,114
Level 3	5,9002	5,907	5,467
Level 2	2,9501	2,884	2,847
Level 1	1,47505	1,373	1,368

Der Zielwert, entstanden aus dem MW der Messungen 1-4., diente als Level 11 und wurde für die anderen Level jeweils um 10% verdünnt, ausgenommen der 50:50 Verdünnung von Level 2 auf Level 1; alle Level wurden zweimal gemessen, alle Werte in µg/l

Tabelle 33: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von SIR

SIR			
1.	30,332	Summe	123,277
2.	32,407	MW/Zielwert	30,81925
3.	31,007		
4.	29,531		
Zielwerte		Lauf 1	Lauf 2
Level 11	30,81925	29,11	27,805
Level 10	27,737325	25,929	27,11
Level 9	24,6554	23,528	22,444
Level 8	21,573475	20,335	20,201
Level 7	18,49155	17,108	17,312
Level 6	15,409625	15,1	15,409
Level 5	12,3277	11,127	11,611
Level 4	9,245775	8,603	8,59
Level 3	6,16385	5,338	5,713
Level 2	3,081925	2,829	3,3
Level 1	1,5409625	1,342	1,478

Der Zielwert, entstanden aus dem MW der Messungen 1-4., diente als Level 11 und wurde für die anderen Level jeweils um 10% verdünnt, ausgenommen der 50:50 Verdünnung von Level 2 auf Level 1; alle Level wurden zweimal gemessen, alle Werte in µg/l

Tabelle 34: Zielwerte und Ergebnisse der Linearität von EVE

EVE			
1.	33,176	Summe	132,506
2.	33,279	MW/Zielwert	33,1265
3.	31,181		
4.	34,87		
Zielwerte		Lauf 1	Lauf 2
Level 11	33,1265	31,037	32,647
Level 10	29,81385	29,98	29,067
Level 9	26,5012	25,454	25,043
Level 8	23,18855	23,095	24,232
Level 7	19,8759	17,742	18,71
Level 6	16,56325	16,287	16,768
Level 5	13,2506	12,268	12,794
Level 4	9,93795	8,915	8,977
Level 3	6,6253	5,839	6,317
Level 2	3,31265	3,509	3,289
Level 1	1,656325	1,474	1,582

Der Zielwert, entstanden aus dem MW der Messungen 1-4., diente als Level 11 und wurde für die anderen Level jeweils um 10% verdünnt, ausgenommen der 50:50 Verdünnung von Level 2 auf Level 1; alle Level wurden zweimal gemessen, alle Werte in µg/l

7.6. Ethikvotum

Diese Studie benötigte ein Ethikvotum, da für die Evaluierung und den Patientenvergleich Blutproben von Patienten verwendet werden sollten.

Das eingereichte Votum wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und am 16.06.2020 genehmigt. Das Aktenzeichen bzw. die Studien-Nr. lautet 2020-965.

8. Danksagung

Großer Dank geht zuerst an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Boege, der mir diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Weiterer Dank geht an meinen Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. med. Boeken und Herrn Dr. med. Hermsen, die immer alles dafür getan haben, meine vielen Fragen zügig und in sehr angenehmer Arbeitsatmosphäre zu beantworten.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Brauers bedanken, der dafür sorgte, dass wir gute und valide Ergebnisse erhielten und für die vielen Blutspenden, die er über sich ergehen lassen musste. Anschließend half Herr Dr. med. Schmidt mir mit der Statistik. Vielen Dank dafür!

Bei Herrn Benomar und den Angestellten des Zentralinstituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Abläufen im Labor und das Verschicken und Sammeln sämtlicher Proben.

Nicht versäumen möchte ich auch dem Labor Limbach und Frau Sauer dafür zu danken uns mehrmals Proben zur Verfügung gestellt zu haben.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich nochmals bei Herrn Prof. Dr. med. Boege und dem Universitätsklinikum Düsseldorf bedanken.

Ein letzter, dafür umso wichtigerer, Dank geht an meine Mama, die nicht nur in Bezug auf diese Arbeit wirklich alles für mich möglich macht.

9. Lebenslauf

Eva-Maria Vogelsberg

Fleher Straße 29
40223 Düsseldorf
Mobil: 017661494115
E-Mail: eva-maria.vogelsberg@uni-
duesseldorf.de

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren am 25.07.1995 in Rüsselsheim
Ledig
Keine Kinder

SCHULBILDUNG

2001-2005	Gemeinschaftsgrundschule Much
2005-2013	Gymnasium Antoniuskolleg, Neunkirchen-Seelscheid

PRAKTIKA

01.04.2011-17.04.2011	Sozialpraktikum in Thailand, Arbeit mit HIV-infizierten Kindern
11.08.2013-16.09.2013	Freiwilligenarbeit mit Kindern in Nepal
16.09.2013-20.10.2013	Freiwilligenarbeit mit Kindern in Indien
20.10.2013-20.11.2013	Freiwilligenarbeit mit Kindern auf Bali
05.03.2014-07.04.2014	Pflegepraktikum in den Kinder-Kliniken Köln
17.04.2014-01.07.2014	Pflegepraktikum Kreiskrankenhaus Gummersbach
22.08.2016-20.09.2016	Famulatur Kinderarztpraxis in Düsseldorf
01.03.2017-15.03.2017	Famulatur Anästhesie in Düsseldorf
16.03.2017-30.03.2017	Famulatur Kinderchirurgie Universitätsklinikum Düsseldorf
26.02.2018-27.03.2018	Famulatur Kinder- und Jugendpsychiatrie LVR-Klinikum Düsseldorf
24.04.2018-24.03.2018	Betreuung von drei Kleinkindern in Schweden
27.08.2018-10.09.2018	Famulatur Orthopädie Praxis Prof. Wehling
11.03.2019-25.03.2019	Famulatur Gynäkologie Lukas-Krankenhaus Neuss
16.11.2020-17.10.2021	Absolvierung des praktischen Jahres an der Uniklinik Düsseldorf, Wahltertial Pädiatrie

80

UNIVERSITÄT

Ab 10.2014	Studium der Humanmedizin an der HHU Düsseldorf
16.09.2017	1. Staatsexamen
11.2017-11.2018	Gewähltes Mitglied der Fachschaftsvertretung
15.04.-17.04.2020	2. Staatsexamen
17.11.2021	3. Staatsexamen
19.11.2021	Erteilung der Approbation

Düsseldorf, den 23.12.2021

10. Literaturverzeichnis

1. Töpfer, G., *Elektrochemilumineszenz-Immunoassay*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 761-762.
2. M. Müller, W.V. and H.M.K.u.G.S. unter Mitwirkung von: J. Angerer, *Die Verwendung der Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie (LC/MS) im biologischen Monitoring [Biomonitoring Methods in German language, 2008]*, in *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. p. 411-470.
3. Wagner, E., *Transplantationschirurgie*, in *Transplantationschirurgie*, E. Albert, et al., Editors. 1981, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 11-16.
4. Vollmar, A.M. and A.L. Gerbes, *Historie und Status quo der Transplantationsmedizin: 50 Jahre Organtransplantation haben die Medizin nachhaltig verändert*. Pharmazie in unserer Zeit, 2005. **34**(4): p. 262-267.
5. Starzl, T.E., *History of clinical transplantation*. World J Surg, 2000. **24**(7): p. 759-82.
6. Schäffner, G. and D. Kabelitz, *Monoklonale Antikörper zur Therapie*. Dtsch med Wochenschr, 2001. **126**(30): p. 851-856.
7. Michels, G. and U.C. Hoppe, *Everolimus*. Dtsch med Wochenschr, 2005. **130**(40): p. 2263-2265.
8. Zhou, H., Y. Luo, and S. Huang, *Updates of mTOR inhibitors*. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(7): p. 571-81.
9. GUNG, K.Ä.R., *Änderung der Arzneimittel-Richtlinien*. Deutsches Ärzteblatt, 2000. **97**(24).
10. Schnülle, P. and F.J. van der Woude, *Mycophenolat Mofetil im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva*. Der Internist, 1998. **39**(8): p. 879-886.
11. Shah, V.V., et al., *Chapter 4 - Methotrexate*, in *Therapy for Severe Psoriasis*, J.J. Wu, S.R. Feldman, and M.G. Lebwohl, Editors. 2016, Elsevier. p. 37-48.
12. Rau, R., *Methotrexat*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2016. **75**(6): p. 599-603.
13. Huang, S. and P.J. Houghton, *Resistance to Rapamycin: A Novel Anticancer Drug*. Cancer and Metastasis Reviews, 2001. **20**(1): p. 69-78.
14. Hofbauer, G., *Immunsuppressiva nach Transplantation*. Der Hautarzt, 2010. **61**(3): p. 214-219.

15. Bavinck, J.N.B., et al., *THE RISK OF SKIN CANCER IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS IN QUEENSLAND, AUSTRALIA: A Follow-up Study*. Transplantation, 1996. **61**(5): p. 715-721.
16. Stallmach, A., *Prinzipien der Immunsuppression*, in *Therapie gastroenterologischer Krankheiten*, W.F. Caspary, J. Mössner, and J. Stein, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 627-635.
17. Chen, Y.Q., et al., *A Putative Sirolimus (Rapamycin) Effector Protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **203**(1): p. 1-7.
18. Gurk-Turner, C., W. Manitpisitkul, and M. Cooper, *A Comprehensive Review of Everolimus Clinical Reports: A New Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor*. Transplantation, 2012. **94**(7): p. 659-668.
19. Naesens, M., D.R.J. Kuypers, and M. Sarwal, *Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **4**(2): p. 481-508.
20. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(6): p. 472-484.
21. Craig Slattery, H.C., Olwyn Johnston, Michael P. Ryan and Tara McMorrow, *Mechanisms of Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity in Chronic Allograft Injury, Chronic Kidney Disease and Renal Transplantation*. February 10th 2012: IntechOpen. 82
22. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
23. Dreyfuss, M., et al., *Cyclosporin A and C*. European journal of applied microbiology and biotechnology, 1976. **3**(2): p. 125-133.
24. Krupp, P., P. Timonen, and A. Gülich. *Side Effects and Safety of Sandimmun® in Long-term Treatment of Transplant Patients*. 1985. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
25. Tönshoff, B., *Cyclosporin-A-Nebenwirkungen nach Nierentransplantation*. Der Nephrologe, 2009. **4**(5): p. 447-448.
26. Mihatsch, M.J., G. Thiel, and B. Ryffel, *Cyclosporin A: action and side-effects*. Toxicology Letters, 1989. **46**(1): p. 125-139.

27. Marzolini, C., et al., *Polymorphisms in Human MDRI (P-glycoprotein): Recent Advances and Clinical Relevance*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2004. **75**(1): p. 13-33.
28. Lin, J.H. and M. Yamazaki, *Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003. **42**(1): p. 59-98.
29. Kämmerer, W., *Klinisch relevante pharmakokinetische Arzneimittelinteraktionen in der Intensivmedizin*. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2012. **107**(2): p. 128-140.
30. Haubeck, H.-D., *Tacrolimus*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 2256-2257.
31. Peters, D.H., et al., *Tacrolimus*. *Drugs*, 1993. **46**(4): p. 746-794.
32. Neuhaus, P., Pichlmayr, and R. Williams, *Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection*. *European FK506 Multicentre Liver Study Group*. *Lancet*, 1994. **344**(8920): p. 423-8.
33. Sehgal, S.N., *Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action*. *Transplantation Proceedings*, 2003. **35**(3, Supplement): p. S7-S14.
34. Sabatini, D.M., et al., *RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs*. *Cell*, 1994. **78**(1): p. 35-43.
35. Gearoid McMahon, M.R.W., Xian C. Li, Didier A. Mandelbrot, *The Evolving Role of mTOR Inhibition in Transplantation Tolerance*. *JASN* Mar 2011, **22** (3) 408-415.
36. Markl, J., et al., *Zellzyklus und Zellteilung*, in *Purves Biologie*, J. Markl, Editor. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 307-344.
37. Murgia, M.G., S. Jordan, and B.D. Kahan, *The side effect profile of sirolimus: A phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients*. *Kidney International*, 1996. **49**(1): p. 209-216.
38. Sádaba, B., et al., *Clinical relevance of sirolimus drug interactions in transplant patients*. *Transplantation Proceedings*, 2004. **36**(10): p. 3226-3228.
39. Mahalati, K. and B.D. Kahan, *Clinical Pharmacokinetics of Sirolimus*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2001. **40**(8): p. 573-585.

40. Zimmerman, J.J. and B.D. Kahan, *Pharmacokinetics of Sirolimus in Stable Renal Transplant Patients after Multiple Oral Dose Administration*. The Journal of Clinical Pharmacology, 1997. **37**(5): p. 405-415.
41. Mutschler, E., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie-Klinische Pharmakologie-Toxikologie*. 2012. 940-952.
42. Gressner A.M., T.A.H., Springer, Berlin, Heidelberg, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019.
43. Kahan, B.D., et al., *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice*. Clin Ther, 2002. **24**(3): p. 330-50; discussion 329.
44. Wünsche, F., *Therapeutisches Drug Monitoring Arzneimitteltherapie nach Maß*, in *Pharmazeutische Zeitung* 17.07.2018.
45. Weber, L.T., *Verbesserung der Arzneimittelsicherheit durch Therapiemonitoring*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2007. **155**(8): p. 724-732.
46. Grebe, S.K. and R.J. Singh, *LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?* The Clinical biochemist. Reviews, 2011. **32**(1): p. 5-31.
47. Johnston, A. and D.W. Holt, *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs*. British journal of clinical pharmacology, 1999. **47**(4): p. 339-350.
48. Spector, R., et al., *Therapeutic drug monitoring*. Clin Pharmacol Ther, 1988. **43**(4): p. 345-53.
49. Seger, C. and M. Vogeser, *Immunsuppressiva-Medikamentenspiegelmessung – reine Routine? / Immunosuppressant drug monitoring: a routine undertaking?* 2010. **34**(3): p. 117.
50. Jaenigen, B.M., et al., *Immunsuppression bei Pankreasorgan-, Insel(zell)- und Nierentransplantation*. Der Diabetologe, 2010. **6**(6): p. 442-450.
51. Gressner AM, A.T.H., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. Vol. 2. Auflage. 2013.
52. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Kapitel 10.1 Immunsuppressiva; pp.911. 25. Auflage ed.* 2017. 1334.
53. Said, R., et al., *Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC–MS/MS allowing automated sample work-up and analysis*. Journal of Chromatography B, 2012. **897**: p. 42-49.

54. Güssregen, B., *LC-MS*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1439-1440, pp.21.
55. Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, *Arbeitsvorschrift für die LC-MS/MS-Bestimmung Automatisiert mit MassSTAR MassTox Immunsuppressiva im Vollblut ONEMINUTE Test*. AV 93900/1200/F Immunsuppressiva OM/MassSTAR DE 01/2017 V5, 2017: p. 40.
56. Paxton, J., *Topics on Drug Metabolism*. 2012: IntechOpen.
57. Stokvis, E., H. Rosing, and J.H. Beijnen, *Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?* *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005. **19**(3): p. 401-407.
58. Daldrup, T. and F. Mußhoff, *Forensische Analytik: Drogen und Arzneimittel*, in *Analytiker-Taschenbuch*, H. Günzler, et al., Editors. 1995, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 183-233.
59. Gritter, R.J., et al., *Einführung in die Chromatographie*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
60. Harris, D.C., *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*, in *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, G. Werner and T. Werner, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 671-714.
61. Skoog, D.A. and J.J. Leary, *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)*, in *Instrumentelle Analytik: Grundlagen — Geräte — Anwendungen*. 1996, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 675-721.
62. Arnold, E. *Die HPLC-Anlage: einfach erklärt*. 26.05.2017; Available from: (21.12.2021).
63. Gross, J.H., *Massenspektrometrie-Spektroskopiekurs kompakt*. 2019. 132.
64. Schneider, H. and W. Steimer, *Tandem-Massenspektrometrie in der therapeutischen Arzneimittelspiegel-Bestimmung: Praxis und Tücken der Anwendung / Tandem mass spectrometry in drug monitoring: experience and pitfalls in application*. *Journal of Laboratory Medicine*, 2006. **30**(6): p. 428.
65. Dahlin, A. *ESI positive mode (21589986840).jpg*. 28.09.2015 29.03.2021; Available from: (21.12.2021).
66. Sparkman, O.D., Z.E. Penton, and F.G. Kitson, *Chapter 4 - Mass Spectrometry Instrumentation*, in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second*

- Edition*), O.D. Sparkman, Z.E. Penton, and F.G. Kitson, Editors. 2011, Academic Press: Amsterdam. p. 89-148.
67. Lohninger H., F.J., Mizaikoff B.; Rosenberg E., *Teach/Me Instrumentelle Analytik*, H. Springer-Verlag, Editor. 14.12.2010.
68. Thomas, L., *Labor und Diagnose, 8. Auflage*, ed. V.T.-B. Frankfurt/Main. 2012.
69. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, *Elecsys Cyclosporine*. Infosheet Cyclosporine Roche Diagnostics, 2018.
70. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, *Elecsys Tacrolimus*. Infosheet Tacrolimus Roche Diagnostics, 2018.
71. Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik Düsseldorf, H.-H.U.D., *Standardarbeitsanweisung Tacrolimus*. 2019: Zentrallabor Universitätsklinikum Düsseldorf.
72. Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik Düsseldorf, H.-H.U.D., *Standardarbeitsanweisung Cyclosporine*. 2019: Zentrallabor Universitätsklinikum Düsseldorf.
73. Team, R.C., *A Language and Environment for Statistical Computing*. 2020, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
74. Van Eeckhaut, A., et al., *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(23): p. 2198-207.
75. Pohanka, A., et al., *Experiences from using LC-MS/MS for analysis of immunosuppressive drugs in a TDM service*. Clin Biochem, 2016. **49**(13-14): p. 1024-31.
76. Tszysrznic, W., et al., *Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay*. Journal of Chromatography B, 2013. **928**: p. 9-15.
77. Lee, Y.W., *Comparison between ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and a chemiluminescence immunoassay in the determination of cyclosporin A and tacrolimus levels in whole blood*. Exp Ther Med, 2013. **6**(6): p. 1535-1539.

78. Polledri, E., et al., *Immunosuppressive drugs in whole blood: validation of a commercially available liquid chromatography/tandem mass spectrometry kit and comparison with immunochemical assays*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017. **31**(13): p. 1111-1120.
79. Becker, S., J. Thiery, and U. Ceglarek, *Evaluation of a novel commercial assay for the determination of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay*. *Ther Drug Monit*, 2013. **35**(1): p. 129-32.
80. Ansermot, N., et al., *Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography–electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique*. *Clinical Biochemistry*, 2008. **41**(10): p. 910-913.
81. Holman, J. and R. Felder, *Robotic Automation of Cyclosporine Analysis in Whole Blood*. *Clinical chemistry*, 1992. **38**: p. 1440-3.
82. Deslandes, G., et al., *Comparison Between an Automated and Manual Extraction for the Determination of Immunosuppressive Drugs Whole Blood Concentrations by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2016. **30**(6): p. 924-929.
83. Adaway, J.E. and B.G. Keevil, *Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012. **883-884**: p. 33-49.
84. Leung, K.S.-Y. and B.M.-W. Fong, *LC–MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come?* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(9): p. 2289-2301.
85. Vogeser, M., *Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring The use of HPLC-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring*. *Journal of Laboratory Medicine*, 2005. **29**(4): p. 278.
86. Volosov, A., K.L. Napoli, and S.J. Soldin, *Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography—tandem mass-spectrometry*. *Clinical Biochemistry*, 2001. **34**(4): p. 285-290.
87. Seger, C., *Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) in clinical routine laboratories*. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2012. **162**(21): p. 499-504.

88. Vogeser, M. and C. Seger, *A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments*. *Clinical Biochemistry*, 2008. **41**(9): p. 649-662.
89. Deters, M., V. Kaefer, and G.I. Kirchner, *Liquid chromatography/mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **492**(1): p. 133-145.
90. Napoli, K.L., et al., *Multi-center evaluation of a commercial Kit for tacrolimus determination by LC/MS/MS*. *Clinical Biochemistry*, 2010. **43**(10): p. 910-920.
91. Staatz, C.E., P.J. Taylor, and S.E. Tett, *Comparison of an ELISA and an LC/MS/MS Method for Measuring Tacrolimus Concentrations and Making Dosage Decisions in Transplant Recipients*. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2002. **24**(5): p. 607-615.
92. Barceló Martín, B., et al., *Rheumatoid factor interference in a tacrolimus immunoassay*. *Ther Drug Monit*, 2009. **31**(6): p. 743-5.
93. Seger, C., K. Tentschert, and A. Griesmacher, *Evaluating performance limitations of a tacrolimus immunoassay by comparison with a HPLC-MS/MS platform*. 2007. 509-509.
94. Sallustio, B.C., B.D. Noll, and R.G. Morris, *Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and immunoassay methods*. *Clinical Biochemistry*, 2011. **44**(2): p. 231-236.
95. Buchwald, A., K. Winkler, and T. Epting, *Validation of an LC-MS/MS method to determine five immunosuppressants with deuterated internal standards including MPA*. *BMC clinical pharmacology*, 2012. **12**: p. 2-2.
96. Pablo, A.H., A.R. Breaud, and W. Clarke, *Analysis of Immunosuppressant Drugs in Whole Blood by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. *Current Protocols in Toxicology*, 2020. **84**(1): p. e92.
97. Karapirli, M., et al., *Simultaneous determination of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in whole-blood samples by LC-MS/MS*. *TheScientificWorldJournal*, 2012. **2012**: p. 571201-571201.
98. Héту, P.-O., R. Robitaille, and B. Vinet, *Successful and cost-efficient replacement of immunoassays by tandem mass spectrometry for the quantification of immunosuppressants in the clinical laboratory*. *Journal of Chromatography B*, 2012. **883-884**: p. 95-101.

99. Christians, U., et al., *Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography–mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000. **748**(1): p. 41-53.
100. Taylor, P.J., *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. *Ther Drug Monit*, 2004. **26**(2): p. 215-9.