

Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



Transportstabilitätsprofiling – Entwicklung eines Testprotokolls

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lars Willems

aus
Daun

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael Vogeser

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Parhofer

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Demant

Promovierter Mitbetreuer: Prof. Dr. Markus J. Schwarz

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 4 |
| Tabellenverzeichnis | 5 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1 Hintergrund und Relevanz | 9 |
| 1.2 Der Probentransport – (k)ein blinder Fleck? | 11 |
| 1.3 Stand der präanalytischen Forschung..... | 12 |
| 1.4 Probenmaterial als dynamisches System | 13 |
| 1.5 Ziel der Arbeit und Forschungsfrage | 15 |
| 2. Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Vorgeschlagene Bedingungen der Stabilitätsmatrix..... | 16 |
| 2.2 Exemplarische Anwendung des Verfahrens | 21 |
| 3. Ergebnisse | 31 |
| 3.1 Messungen Routinelabor | 31 |
| 3.2 Messungen Massenspektrometrie | 47 |
| 3.3 Messungen Übersichtstabelle | 60 |
| 4. Diskussion | 62 |
| 4.1 Interpretation | 63 |
| 4.2 Limitationen der Arbeit | 70 |
| 4.3 Ausblick..... | 72 |
| 5. Zusammenfassung | 73 |
| 6. Literaturverzeichnis | 76 |
| Danksagung | 82 |
| Affidavit | 83 |
| Publikationsliste | 84 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufzeichnungen der Thermologger | 23 |
| Abbildung 2: Darstellung der Einzelmesswerte je Proband (A-E) | 27 |
| Abbildung 3: Darstellung der Messdatenverdichtung. | 28 |
| Abbildung 4: Kalium. | 32 |
| Abbildung 5: Glucose. | 33 |
| Abbildung 6: Harnstoff..... | 34 |
| Abbildung 7: Harnsäure | 35 |
| Abbildung 8: Ferritin | 36 |
| Abbildung 9: Albumin | 37 |
| Abbildung 10: IgG | 38 |
| Abbildung 11: Gamma-GT | 39 |
| Abbildung 12: Lipase..... | 40 |
| Abbildung 13: Cholesterin | 41 |
| Abbildung 14: Triglyceride..... | 42 |
| Abbildung 15: LDL-Cholesterin | 43 |
| Abbildung 16: HDL-Cholesterin..... | 44 |
| Abbildung 17: non-HDL-Cholesterin..... | 45 |
| Abbildung 18: Cycstatin C..... | 46 |
| Abbildung 19: Cortisol | 48 |
| Abbildung 20: Cortison | 49 |
| Abbildung 21: 11-Deoxyccortisol..... | 50 |
| Abbildung 22: Corticosteron | 51 |
| Abbildung 23: DHEA | 52 |
| Abbildung 24: DHT | 53 |
| Abbildung 25: Testosteron | 54 |
| Abbildung 26: 17-OH-Progesteron | 55 |
| Abbildung 27: 11-DOC | 56 |
| Abbildung 28: Androstenedion | 57 |
| Abbildung 29: Aldosteron | 58 |
| Abbildung 30: DHEAS | 59 |
| Abbildung 31: Stabilitätsübersicht der untersuchten Analyten | 61 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Vorgeschlagene Stabilitätsmatrix | 18 |
| Tabelle 2: Inkubationsmatrix mit Zeit und Temperatur der Exposition | 20 |
| Tabelle 3: Proof-of-concept Stabilitätsmatrix | 28 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| CRESS..... | Checklist for Reporting Stability Studies |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| DHEAS | Dehydroepiandrosteronsulfat |
| DHT | Dihydrotestosteron |
| DOC | Deoxycorticosteron |
| EFLM | European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| IgG | Immunglobulin G |
| IVD | In-vitro Diagnostika |
| LC-MS/MS | Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie- Kopplung |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| MS | Microsoft |
| MU | Messunsicherheit |
| QK-Probe | Qualitätskontroll-Probe |
| SD | Standardabweichung |
| VK | Variationskoeffizient |

1. Einleitung

„Eine gut funktionierende Labordiagnostik stellt ein kleines, aber wichtiges Bindeglied zwischen Diagnostik und Therapie und damit zwischen richtiger Krankheitserkennung und geeigneter Therapie dar. Da die Labormedizin am Anfang des Behandlungsprozesses steht, multiplizieren sich Erfolge und Misserfolge über den gesamten Behandlungsprozess; es besteht damit eine große Hebelwirkung.“ (Arbeitsgruppe Ökonomischer Nutzen der Labormedizin, Schweizerische Union für Laboratoriumsmedizin [SULM])

Die Laboratoriumsmedizin befasst sich mit der Untersuchung und Bewertung von diagnostischen Proben. Eine diagnostische Probe ist jedes menschliche oder tierische Material, das zu Forschungs-, Diagnose- oder Testzwecken gesammelt wird. Dies können feste Bestandteile (z. B. Gewebeproben) oder flüssige Bestandteile (z. B. Blut, Urin, Liquor) sein (1).

Die gewonnenen Analyseergebnisse spielen eine wichtige Rolle bei der Entscheidungsfindung konkreter Therapien, als Präventivmaßnahme oder auch zur Stadien-Einteilung von Erkrankungen.

Das Ziel von labordiagnostischen Untersuchungen ist die möglichst exakte Ermittlung eines Messgrößenwertes zum Zeitpunkt einer Probenentnahme. Um dies zu erreichen sind erstens die Verwendung von präzisen Messinstrumenten und zweitens die Stabilität der entnommenen Probe bis zu

deren Analyse erforderlich.

Stabilität bedeutet, den zum Zeitpunkt der Probenentnahme vorhandenen Messgrößenwert unter festgelegten Lagerungsbedingungen wie zum Beispiel Temperatur, chemischen Stabilisatoren oder UV-Schutz während eines bestimmten Zeitraumes im Bereich von definierten Abweichungsgrenzen zu halten. Um die Interpretierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, ist es notwendig, diese Grenzen nach medizinischen Anforderungen zu definieren.

1.1 Hintergrund und Relevanz

Laboruntersuchungen spielen eine zentrale Rolle in der modernen Medizin. Probestests sind ein wichtiges Instrument der Krankheitsdiagnostik und um den Therapieerfolg zu kontrollieren. Es gibt verschiedene Techniken zur Probengewinnung und -analyse (2). Besonders entscheidend sind in der Labordiagnostik sowohl die Schnelligkeit der Bearbeitung des Probenmaterials als auch die Genauigkeit bzw. Validität der Laborergebnisse (3).

Bei der Gesamtzahl an Laboruntersuchungen pro Jahr in Deutschland ist von einem Milliardenbereich auszugehen.

Für das Fachgebiet der Labormedizin werden von 1.000 Versicherten 863 Konsultationsfälle pro Jahr (2019) angegeben mit durchschnittlichen Leistungskosten von 29 Euro je Fall. Anteilig lagen die Kosten für Laborleistungen an den gesamten Behandlungskosten bei 4,2%. Bei den Gesamtgesundheitsausgaben der Bundesrepublik Deutschland (2019) fielen ca. 2,7%, etwa 11,2 Milliarden Euro für Leistungen der Labormedizin an. Die Labormedizin ist bei 85% - 90% der Patientenfälle beteiligt, sie verursacht jedoch nur 4% - 5% der Behandlungskosten und hat somit einen hohen Kosten-/ Nutzenfaktor (2).

Ein Großteil heutiger Laboranalysen findet in überregional zuständigen Laboren statt. Allein im „Labor Berlin“, einem der größten Labordienstleister in Deutschland, werden täglich circa 19.500 Proben bearbeitet und jährlich über 60 Millionen Analysen durchgeführt (4). Der Prozess von der

Probengewinnung bis zur Befunderstellung wird in der Labormedizin in die Bereiche der Präanalytik, Analytik und Postanalytik unterteilt. Dabei bezeichnet die Präanalytik den Teil, der vor der technischen Messung Einfluss auf das Ergebnis haben kann. Konkret beinhaltet dies u.a. die Probengewinnung, den Probentransport und die Probenvorbereitung. Die Analytik beschreibt die technische Durchführung der Messung. Unter Postanalytik wird der Prozessabschnitt nach dem Erfassen eines Messwertes bis zur Befunderstellung und Ergebnisübermittlung an den Anforderer der Diagnostik verstanden (5).

1.2 Der Probentransport – (k)ein blinder Fleck?

Diagnostische Proben sind während des Transports zu Laboratorien einem Spektrum von Variablen ausgesetzt, die einen potenziellen Einfluss auf die Probe und die darin enthaltenen Analyten haben können. Bei der Transportdauer oder beim Transportweg kann es sich um wenige Minuten bzw. Meter innerhalb einer Klinik handeln oder um einen bis zu mehreren Tagen dauernden und viele Kilometer überbrückenden Versand zu Zentrallaboren. Um Entscheidungen über notwendige oder nicht notwendige Transportbedingungen treffen zu können, werden gezielt Stabilitätsuntersuchungen auf verschiedenste Arten durchgeführt (6). So lassen sich spezifische Eigenschaften der untersuchten Analyten abbilden und Bedingungen im präanalytischen Intervall anpassen.

1.3 Stand der präanalytischen Forschung

Die Bedeutung der Befolgung präanalytischer Richtlinien für die allgemeine Sicherheit der Labormedizin ist inzwischen allgemein anerkannt (7–9). Im Laufe der Jahre wurden große Mengen wissenschaftlicher Daten zur Präanalytik generiert (6, 10–23). Der Nutzen dieser Daten ist jedoch begrenzt, da kaum transparente oder einheitliche Protokolle befolgt wurden. Die „Checklist for Reporting Stability Studies“ (CRESS) der Arbeitsgruppe der European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) für die präanalytische Phase ist in dieser Hinsicht ein wichtiger Schritt (24). Hier werden erstmals Standards für die Beschreibung von Studien in der präanalytischen Phase formuliert, ohne ein verbindliches Verfahren zu bevorzugen.

1.4 Probenmaterial als dynamisches System

Probenmaterial aus dem menschlichen Körper stellt eine Momentaufnahme eines äußerst komplexen und dynamischen Systems dar, in dem physiologische Stoffwechselprozesse ablaufen und gleichzeitig Biomoleküle (enzymatischen oder spontanen) chemischen (oder konformatorischen) Veränderungen unterliegen. Es gibt zahlreiche präanalytische Faktoren, die die Konzentration der Analyten, das Messverfahren oder das Testergebnis beeinflussen können. Diese Faktoren lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Einflussfaktoren und Störfaktoren (Interferenzen). Einflussfaktoren sind Auswirkungen auf Laborergebnisse biologischen Ursprungs, die am häufigsten *in vivo* auftreten, aber auch von der Probe *in vitro* während des Transports und der Lagerung herrühren können. Biologische Einflussfaktoren führen methodenunabhängig zu Veränderungen in der Menge des Analyten. Unter Störfaktoren versteht man Mechanismen und Faktoren, die bei Laboruntersuchungen eines bestimmten Analyten zu fälschlich erhöhten oder verminderten Ergebnissen führen und damit die komplette Messung unbrauchbar machen (25).

So unterliegen sowohl die einzelne Messgröße (die zu messende Größe) als auch die Probenmatrix in der präanalytischen Phase potenziell zahlreichen Einflüssen. Der diagnostische Nutzen klinisch-chemischer Analysen setzt voraus, dass diese komplexen, dynamischen präanalytischen Prozesse unter Kontrolle sind. Während für Pharmazeutika und Reagenzien

angemessene Teststandards zur Beurteilung von Stabilität oder Haltbarkeit festgelegt wurden, ist dies bei diagnostischen Proben nicht der Fall (26–29).

1.5 Ziel der Arbeit und Forschungsfrage

Gegenstand dieser Arbeit ist die Beleuchtung der präanalytischen Phase und im Speziellen die Untersuchung der Transportstabilität. Konkretes Ziel ist es, ein Schema zu entwickeln, welches eine umfassende und standardisierte Charakterisierung der Transport- und Lagerstabilität für Laboruntersuchungen im Sinne eines Stabilitätsprofils definierter Messgrößen ermöglicht. Durch bessere Vergleichbarkeit und Beurteilbarkeit von einzelnen Stabilitätsuntersuchungen könnte dadurch ein Beitrag zur Qualitätsförderung geleistet werden. Des Weiteren wird die Umsetzbarkeit und Praktikabilität des vorgeschlagenen Schemas anhand von Beispielanwendungen mit 15 Standard-Routineuntersuchungen der klinischen Chemie sowie 12 Steroiden im MS-Assay untersucht.

2. Material und Methoden

Diese Arbeit befasst sich zum einen mit dem theoretischen Ansatz der Erstellung eines breit anwendbaren Protokolls. Dieses soll eine Möglichkeit aufzeigen, Stabilitätsuntersuchungen in einem standardisierten Rahmen durchzuführen, gleichzeitig aber flexibel anwendbar auf unterschiedliche Forschungsfragen und Interessen sein. Zum anderen wird dieses Protokoll auf die Anwendbarkeit und Praktikabilität bei fünf freiwilligen, gesunden Probanden überprüft.

2.1 Vorgeschlagene Bedingungen der Stabilitätsmatrix

Das vorgeschlagene generische Protokoll umfasst die folgenden vier Schlüsselemente:

- a) Für die Bewertung der detaillierten Transport- (oder Lager-) Stabilitätsprofile werden die Proben einem Spektrum von spezifizierten Temperaturen und Lagerungsdauern ausgesetzt. Diese Variablen einer spezifischen Stabilitätsstudie werden in einer Matrix beschrieben (*Tabelle 1*).
- b) Für diesen Inkubationsplan wird ein isochrones Protokoll verwendet (*Tabelle 2*). Das bedeutet, dass mehrere identische Probenaliquote zu Beginn des Untersuchungszeitraums hergestellt oder gewonnen werden. Diese Aliquote werden dann den vordefinierten

Bedingungen ausgesetzt. Nach bestimmten Zeitintervallen werden die jeweiligen Aliquote für die Lagerung bei -80 °C vorbereitet (d. h. Zentrifugation der Primärprobenröhrchen und Einfrieren des gewonnenen Serums). Eine dieser Proben wird unmittelbar nach der Entnahme aufbereitet und als Kontrollprobe eingelagert. Die Analyse aller zurückgestellten Probenaliquote wird schließlich in einem einzigen Lauf durchgeführt.

- c) Um die Transportstabilität von Vollblut-Primärproben zu untersuchen, wird für jede Temperatur- /Expositionsdauer-Kombination ein separates Primärprobenröhrchen gewonnen und exponiert, dessen Probenmaterial nach der Entnahme nicht geteilt werden muss. Um die negativen Folgen von Blutverlusten bei den Probanden so gering wie möglich zu halten, ist die Verwendung von Primärprobenbehältern mit reduziertem Volumen empfehlenswert (gleiche Oberflächenspezifikation wie bei routinemäßig verwendeten Standard-Volumenröhrchen).
- d) Bei der Bewertung der Ergebnisse wird die Messunsicherheit der verwendeten Analysemethoden berücksichtigt.

Tabelle 1: Vorgeschlagene Stabilitätsmatrix für die Beschreibung von Bedingungen in Stabilitätsstudien mit Beispielen für mögliche Realisierungen. (30)

| VARIABLE | MÖGLICHE REALISIERUNGEN (BEISPIELE) |
|--|---|
| MESSWERT / ANALYT | Glucose, Ferritin, Albumin |
| VERFAHREN VON INTERESSE | <ul style="list-style-type: none"> -Versand der Proben per Post von der Arztpraxis zum zertifizierten Labor - Lagerung von Serum-Aliquoten für spätere Anfragen - Krankenhausinterner Versand der Proben von den Stationen zum Zentrallabor per Rohrpost |
| UNTERSUCHUNGSMATERIAL | <ul style="list-style-type: none"> - Vollblut, EDTA-Antikoaguliert - Serum - Liquor |
| PROBENBEHÄLTER | <ul style="list-style-type: none"> - 4,3-mL-Vollblutprobenröhrchen mit Spritze zur Gewinnung von Serum mit Separatorgel - 4-mL-Polypropylenröhrchen für die Aufbewahrung von Serumaliquoten nach der Zentrifugation von Primärproben |
| TEMPERATURSPANNE | <ul style="list-style-type: none"> - +4°C - +40°C - +15°C - + 28°C |
| STRESSEXPOSITION | <ul style="list-style-type: none"> - horizontaler Schüttler zur Simulation des Transports (70 Umdrehungen pro Minute) - Lagerung ohne Schütteln im Kühlschrank zur Aufbewahrung von Blutprodukten |
| ANZAHL UND BEREICH DER-TEMPERATURVERHÄLTNISSE | <ul style="list-style-type: none"> - n=4: +4°C; +25°C, +30°C; +40 °C - n=2: +25°C, +35°C |
| GESAMTEXPOSITIONSZEIT | <ul style="list-style-type: none"> - 36 h - 12 h |
| ANZAHL UND MESSZEIT-PUNKTE | <ul style="list-style-type: none"> - n=5: nach 4 h; 8 h; 24 h; 48 h; 72 h Expositionsdauer - n=3: nach 20 min, 40 min, 60 min Expositionsdauer |
| ANZAHL STUDIENTEILNEHMER | n=5; n=50 |
| BESCHREIBUNG DER STU-DIENTEILNEHMER | <ul style="list-style-type: none"> - gesunde Personen, Alter 25-43 Jahre, 5 männlich, 5 weiblich, keine weiteren Ein- oder Ausschlusskriterien - zusätzlich: 30 Minuten Ruhezeit vor der Probenahme |

| | |
|---|--|
| VORBEREITUNG DER PROBEN VOR DER LAGERUNG IM ISO- CHRONSCHEMA | <ul style="list-style-type: none">- Zentrifugation, (20°C, 3000G, 10min), Überführung der Serumaliquote in 5 Reaktionsgefäße (Eppendorf, 1 mL), je 200 µL- keine Vorbereitung, Einfrieren der Vollblutproben |
| ANALYTISCHE VERFAHREN | <ul style="list-style-type: none">- Quantifizierung des Gesamtserumproteins auf dem Analysesystem für klinische Chemie xyz gemäß den Anweisungen des Herstellers- Quantifizierung von 15 Steroidhormonen mit LC-MS/MS auf der Grundlage des IVD-CE-Kits xx |
| BESTIMMUNG DER MESSUNSI- CHERHEIT DER ANGEWAND- TEN ANALYSEMETHODE | <ul style="list-style-type: none">- 10-fache Bestimmung der Zielmessgröße innerhalb der analytischen Charge des isochronen Schemas in einer mittleren QK-Probe, 2x Standardabweichung- Routinedaten der internen QK aus 21 Serien des Vormonats, mittlere QK-Probe, 3-fache Standardabweichung |
| STATISTISCHES AUSWER- TUNGSVERFAHREN | <ul style="list-style-type: none">- Berechnung der prozentualen Veränderung des Ergebnisses zwischen der Ausgangsprobe und der untersuchten Probe- Berechnung des Medians der prozentualen Veränderung für alle Untersuchungsproben zu jedem Beobachtungszeitpunkt (definiert durch Expositionszeit und Temperatur) |

*Tabelle 2: Inkubationsmatrix mit Zeit und Temperatur der Exposition und vorgeschlagener Proben -
 identifikation (X als Identifikator des jeweiligen Spenders; Zahl 1: Inkubationszeit; Zahl 2: Inkuba-
 tionstemperatur; Gesamte Inkubationsproben X11-X54, n=20 eines Probanden)*

| Tem- pe- ra- tur | Zeit | | | | |
|---------------------------|------|-----|------|------|------|
| | 4 h | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 4 °C | X11 | X21 | X31 | X41 | X51 |
| 23 °C | X12 | X22 | X32 | X42 | X52 |
| 30 °C | X13 | X23 | X33 | X43 | X53 |
| 40 °C | X14 | X24 | X34 | X44 | X54 |

2.2 Exemplarische Anwendung des Verfahrens

Fünf gesunde Probanden wurden ausgewählt, aufgeklärt und gaben ihre informierte Zustimmung. Das Protokoll dieser Untersuchung wurde von der zuständigen Ethikkommission der LMU München genehmigt (Munich Study of Preanalytical and Analytical Laboratory Test Establishment [MyTest] Projekt Nr.: 17-012).

Bei jedem Probanden wurde venöses Blut in 21 Serumprobenröhrchen (1,2 mL, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Kat. Nr. 6.1663.001) entnommen.

Jedem Probanden wurde eine Vollblutmenge von 24 mL abgenommen und zur Analyse verarbeitet. In Summe bedeutet dies eine sehr effiziente Verwertung der Vollblutmenge von ca. 400 µl pro Analyten.

Eine dieser jeweiligen Proben dient als Kontrollprobe und wurde sofort zentrifugiert und das Serum wurde bei -80 °C in einem geeigneten Sekundärbehälter (2 mL Safe-Lock Röhrchen, Eppendorf, Deutschland) aufbewahrt.

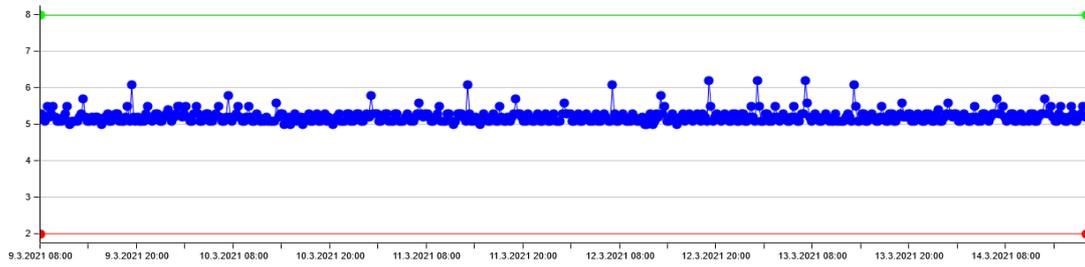
Jeweils 5 der 20 unbearbeiteten Probenröhrchen wurden bei 4 °C, 23 °C, 30 °C bzw. 40 °C gelagert (± 1 °C, Temperaturüberwachung durch einen elektronischen Thermologger) (*Abbildung 2*). Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme den verschiedenen Dauer-/Temperaturbedingungen per Zufallsprinzip zugeteilt.

Zu fünf definierten Zeitpunkten (4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h) wurde jeweils eine Probe aus den verschiedenen Temperatur-Lagerungsbedingungen

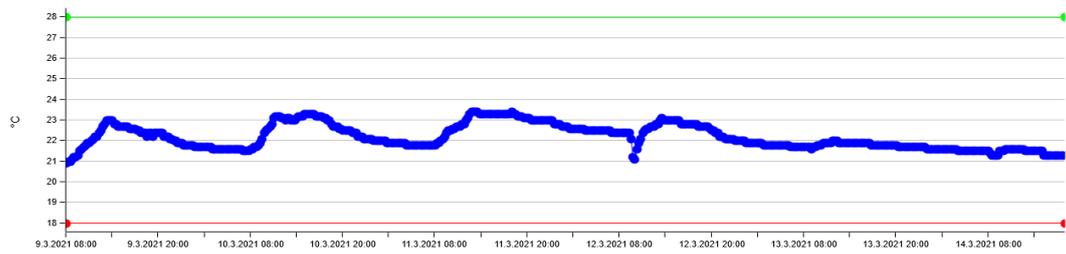
entnommen, zentrifugiert (3.000 g, 20 °C, 10 min) und das Serum bei -80 °C in zwei Aliquote à 200 µL (2 mL Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Deutschland) eingelagert. Durch das Erzeugen von zwei Aliquoten war die Umsetzbarkeit der beiden geplanten isochronen Messreihen der Routinediagnostik und Massenspektrometrie gegeben.

Die Variablen für Temperatur, Expositionsdauer usw. dieses Experiments sind in den *Tabellen 2 und 3* aufgeführt.

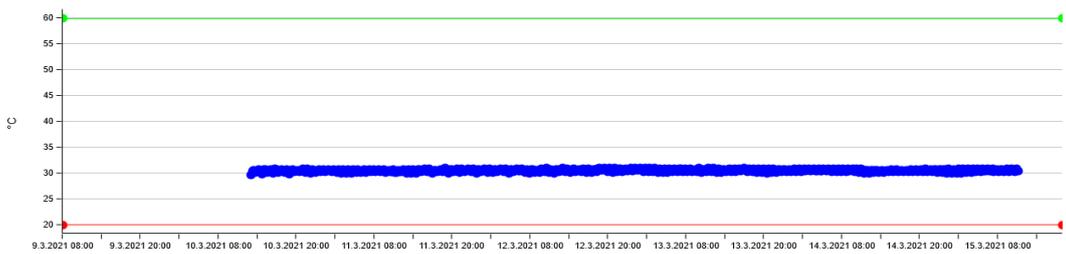
1)



2)



3)



4)

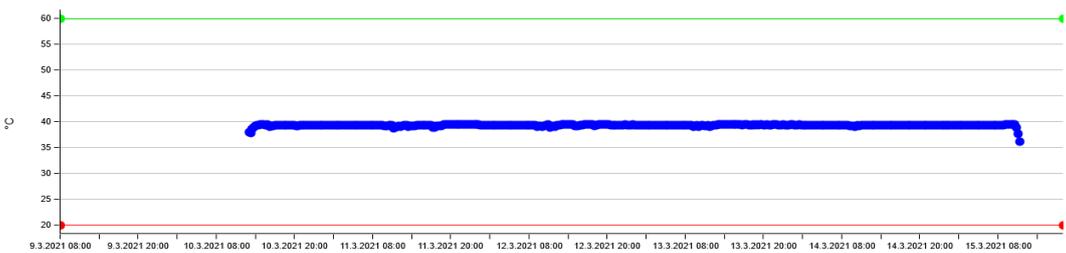


Abbildung 1: Aufzeichnungen der Thermologger während der Blutprobeninkubation; 1) Kühl- schrank; 2) Laborraum; 3) Wärmeschrank 1; 4) Wärmeschrank 2.

Nach dem Ende des Studienzeitraums erfolgte die Analyse der gesammelten Proben nach dem isochronen Prinzip. Zunächst wurden die 21 Serumproben jedes Probanden aufgetaut (15 min bei 24 °C, gefolgt von sorgfältigem Vortex-Mischen). Anschließend erfolgte die Analyse aller aufgetauten und Vortex-gemischten Aliquote in einem Analysedurchgang der 15 Messgrößen in direkter Folge mit Standardtests auf einem Routinesystem für die klinische Chemie (Roche Cobas 8000, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Die 15 Analyten der durchgeführten Routinediagnostik waren Kalium, Glucose, Harnstoff, Harnsäure, Ferritin, Albumin, IgG, Gamma-GT, Lipase, Cholesterin, Triglyceride, LDL- und HDL-Cholesterin, non-HDL-Cholesterin und Cycstatin C.

Die MS-Steroidanalysen (Waters Xevo-TQS Triple-Stage-Massenspektrometer mit einer Acquity UPLC gekoppelt, Waters, Milford, MA, USA) wurden aus dem zweiten Aliquot mit einem LC-MS/MS-Kit (MassChrom, Chromsystems, Gräfelfing, Deutschland) durchgeführt. Die Durchführung der MS-Analyse erfolgte, wie auch die Routinediagnostik, nach dem isochronen Prinzip. Zunächst wurden auch hierbei die 21 Serumproben jedes Probanden aufgetaut (15 min bei 24 °C, gefolgt von sorgfältigem Vortex-Mischen). Anschließend erfolgte die Analyse aller aufgetauten und Vortex-gemischten Aliquote in einem Analysedurchgang der 12 Messgrößen in direkter Folge. Die LC-MS/MS Messung wurde für die 12 Analyten Aldosteron, Androstenedion, Cortisol, 11-Deoxycortisol, Cortison, Corticosteron, 11-

Deoxycorticosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), 17-OH-Progesteron, Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) durchgeführt.

Es wurden nach diesem Prinzip 27 Messungen an jedem erstellten Aliquot durchgeführt. Daraus ergibt sich eine Summe von 2835 durchgeführten Messungen an allen Patientenproben der gesamten Studie.

Die Messunsicherheit der jeweiligen Analyseverfahren wurde durch 21-fache Analyse eines Serumprobenpools im Normalbereich bestimmt. Standardabweichungen und Variationskoeffizienten wurden für jede Messgröße berechnet. Die ± 3 -VK-Bereiche wurden als Schätzung der Messunsicherheit der jeweiligen Messgrößen in dem jeweiligen Konzentrationsbereich verwendet.

Basierend auf diesem Schema ergeben sich für jeden der 20 (4 Temperaturen x 5 Zeitpunkte) Beobachtungspunkte für die Kombination von Lagertemperatur und Exposition (*Tabelle 2*) je fünf Messergebnisse der Probanden pro Messgröße und Temperatur.

Für jedes Ergebnis nach der Exposition wird die prozentuale Veränderung gegenüber dem individuellen Ausgangsergebnis (gemessen an der unmittelbar aufbereiteten und eingelagerten Kontrollprobe) berechnet.

Aus diesen 5%igen Änderungsergebnissen pro Beobachtungspunkt wurde die Medianveränderung gegenüber dem individuellen Ausgangsergebnis berechnet. Wie in *Abbildung 3* exemplarisch für Glucose bei 23°C

dargestellt, bedeutet dies, dass der Medianwert von 100 mg/dl zum Entnahmzeitpunkt in Bezug zum Medianwert von 72 Stunden gesetzt wird. Dieser entspricht für Glucose bei 23°C 10 mg/dl. Daraus ergibt sich nach 72 Stunden eine mediane Glucosekonzentration von 10% des Median-Ausgangswertes.

Dieser mittlere prozentuale Änderungswert wurde zu der ermittelten Messunsicherheit für die jeweilige Messgröße, wie sie mit der Wiederholungsmessung ermittelt wurde, in Beziehung gesetzt.

Als Bewertungsregel wurde festgelegt, dass die Stabilität des Messgrößenmesswerts angenommen wurde, wenn die mittlere prozentuale Veränderung kleiner war als der dreifache Variationskoeffizient, der für das Messverfahren wie oben beschrieben ermittelt wurde.

Zur Visualisierung der verdichteten Daten wurde die prozentual beobachtete Medianänderung der Ergebnisse für die fünf Proben gegen die Dauer der Temperatureinwirkung für die verschiedenen Temperaturen (mit verschiedenen Farben kodiert) in einem Diagramm dargestellt (*Abbildungen 4-30*).

Im letzten Schritt wurde eine praktische Anleitung für den Versand von unbehandelten Serumproben für die Messgrößen formuliert. Aus Gründen der Kosteneffizienz haben die Verarbeitung von Probenmaterial und der damit verbundene Probenversand in Zentrallabore weiter an Bedeutung gewonnen.

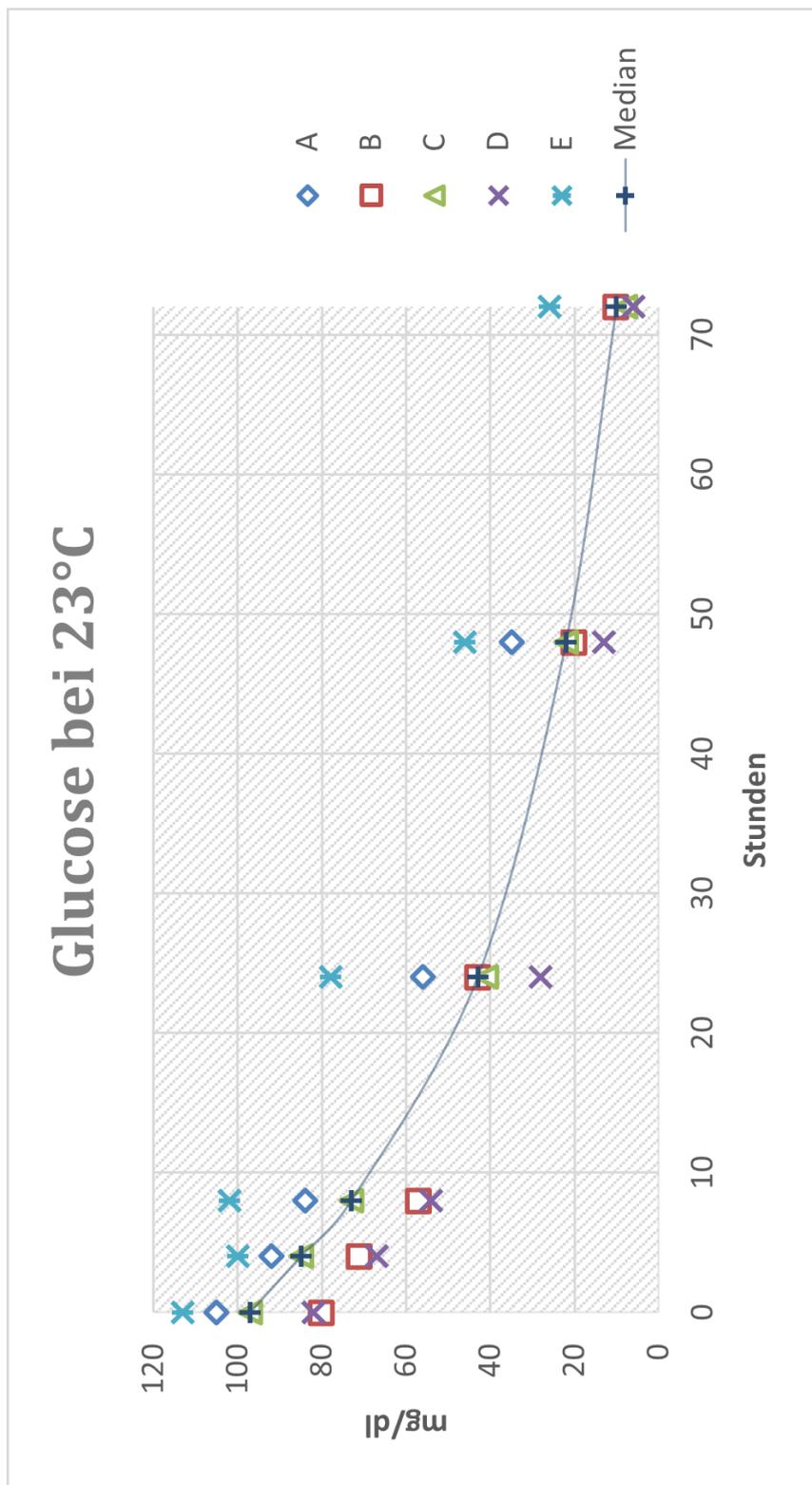


Abbildung 2: Darstellung der Einzelmesswerte je Proband (A-E) und des Medians am Beispiel der Glucose bei 23°C.

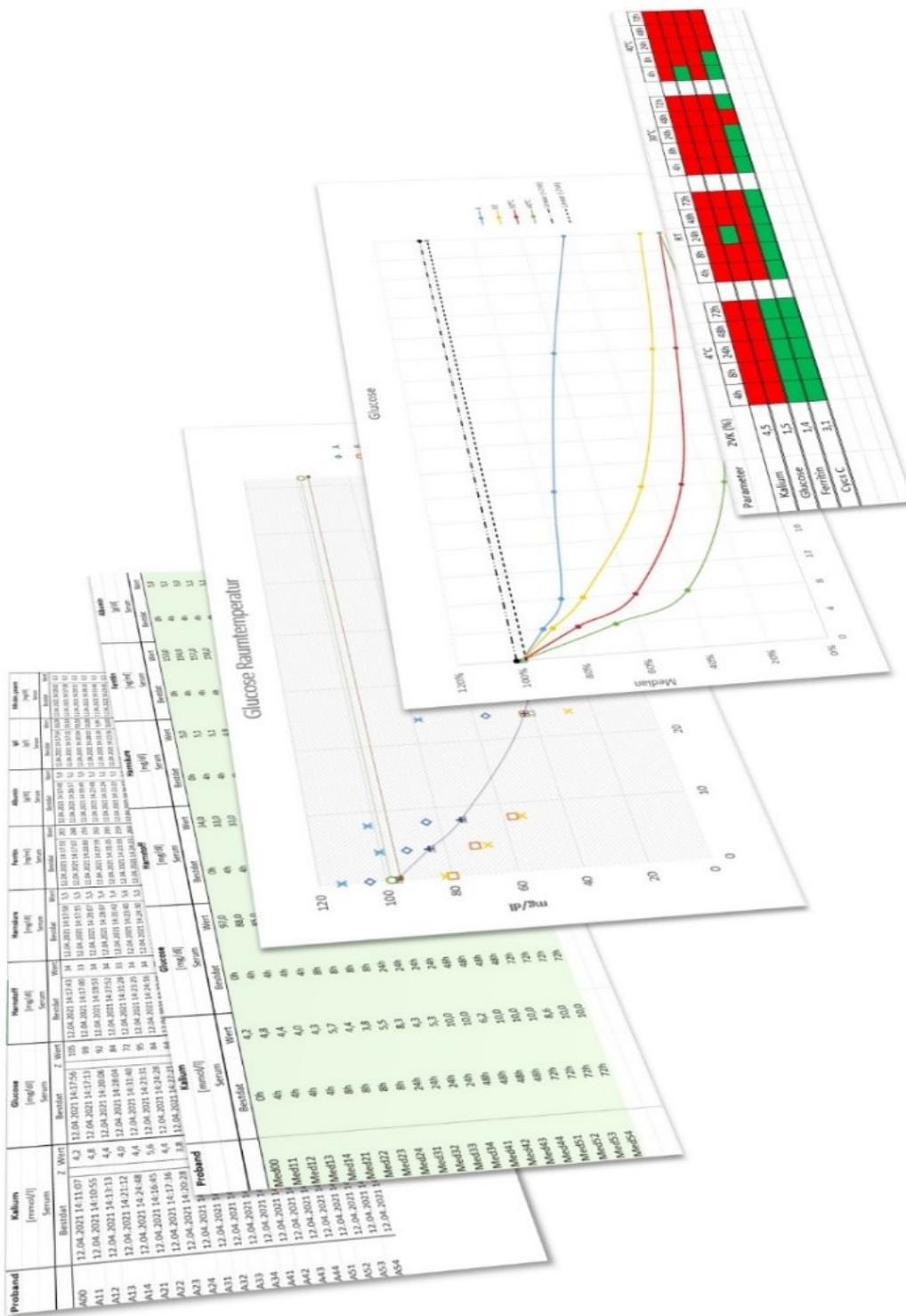


Abbildung 3: Darstellung der Messdatenverdichtung v.h.n.v.: Gesamte Messwerte eines Probanden, Berechnung der prozentualen Abweichungen der Inkubationsprobe zur Kontrollprobe, Darstellung der Medianwerte eines Analyten zu einer Temperatur, Darstellung der Medianwerte eines Analyten zu allen Beobachtungszeitpunkten, Übersicht zur Stabilität (grün) oder Instabilität (rot) der Analyten nach den festgelegten Stabilitätskriterien.

Tabelle 3: Proof-of-concept Stabilitätsmatrix (gemäß Tabelle 1)

| VARIABLE | REALISIERUNGSEIGENSCHAFT |
|---|--|
| MESSWERT / ANALYT | 15 Routineuntersuchungen der klinischen Chemie; 12 Steroide MS-Assay |
| VERFAHREN VON INTERESSE | Versand der Proben per Post von der Arztpraxis zum Zentrallabor |
| UNTERSUCHUNGSMATERIAL | Vollblut mit Gerinnungsaktivator |
| PROBENBEHÄLTER | 1,2 mL Vollblutprobenröhrchen mit Spritze (Monovette, Sarstedt, Kat. Nr. 6.1663.001) |
| TEMPERATURSPANNE | +4°C - +40°C |
| STRESSEXPOSITION | Lagerung von Primärproben ohne Aufrühren im Standard-Laborkühlschrank oder Laborofen |
| ANZAHL UND BEREICH DER TEMPERATURVERHÄLTNISSE | n=4: +4°C; +23°C, +30°C; +40°C |
| GESAMTEXPOSITIONSZEIT | 72 h |
| ANZAHL UND MESSZEITPUNKTE | n=5: nach 4 h; 8 h; 24 h; 48 h; 72 h Expositionsdauer |
| ANZAHL STUDIENTEILNEHMER | n=5 |
| BESCHREIBUNG DER STUDIENTEILNEHMER | scheinbar gesunde Personen, Alter 25-43 Jahre, 4 männlich, 1 weiblich, keine weiteren Ein- oder Ausschlusskriterien |
| VORBEREITUNG DER PROBEN VOR DER LAGERUNG IM ISOCHRONSCHEMA | Zentrifugation der Primärröhrchen (20°C, 3000 g, 10 min), Überführung der Serumaliquote in 2 Reaktionsgefäße (Eppendorf, 2 mL, Schnappdeckel), je 200 µL. Lagerung bei -80°C bis zur Analyse |
| ANALYTISCHE VERFAHREN | - Quantifizierung aller Messgrößen auf dem klinisch-chemischen Analysesystem Roche Cobas 8000 gemäß den Anweisungen des Herstellers - Quantifizierung von 15 Steroidhormonen mit LC-MS/MS Waters Xevo-TQS Triple-Stage-Massenspektrometer mit eine Acquity UPLC gekoppelt, Waters, Milford, MA, USA auf der Grundlage eines IVD-CE-Kits, Chromsystems |
| BESTIMMUNG DER MESSUNSICHERHEIT DER ANGEWANDTEN ANALYSEMETHODE | 21-fache Bestimmung der Zielmessgrößen innerhalb einer separaten analytischen Charge innerhalb der Woche der Studienmessungen in einer zufällig ausgewählten Patientenrestprobe. Bestimmung der SD der Ergebnisse und Schätzung der Messunsicherheit als +/- 3 VK |

| | |
|---|---|
| STATISTISCHES TUNGSVERFAHREN | AUSWER- Berechnung der prozentualen Veränderung des Ergebnisses zwischen den Ausgangsproben und den untersuchten Proben Berechnung des Medians der prozentualen Veränderung für alle Untersuchungsproben zu jedem Beobachtungszeitpunkt (definiert durch Expositionszeit und Temperatur) Wenn der Median der prozentualen Veränderung kleiner ist als die geschätzte Messunsicherheit der Analysemethode, wird die Stabilität der Messgröße für diese Bedingung angenommen. |
|---|---|

3. Ergebnisse

Die Entnahme von Blutproben (n=21) in kleinvolumige Serumbehälter (1,2 mL) pro Studienteilnehmer wurde als praktikabel erachtet, sodass insgesamt weniger als 30 mL Blut pro Teilnehmer erforderlich waren.

Aus dem je Serumbehälter gewonnenen Analysematerial konnten 27 Analyten bestimmt werden, daraus 15 Routinelaborparameter (Roche Cobas 8000) und die Quantifizierung von 12 Steroidhormonen mit LC-MS/MS (Waters Xevo-TQS Triple-Stage-Massenspektrometer mit eine Acquity UPLC gekoppelt, Waters, Milford, MA, USA) auf der Grundlage eines IVD-CE-Kits der Firma Chromsystems.

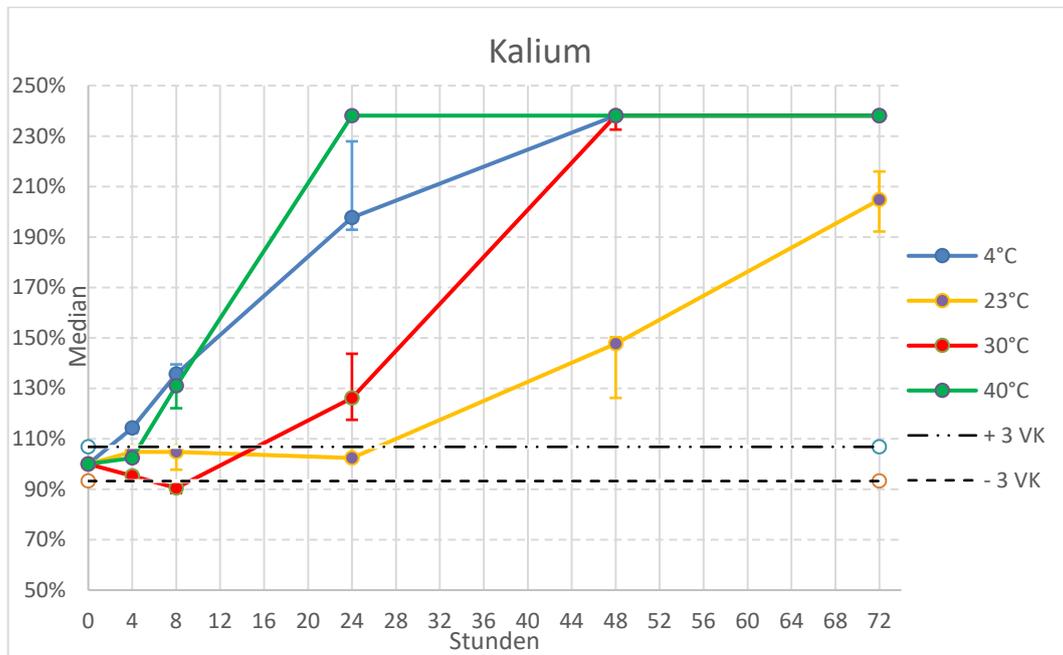
Ein MS Excel Spreadsheet wurde konfiguriert, um die vorgeschlagenen Berechnungen anhand der einzelnen Messdaten durchzuführen und die Ergebnisse entsprechend darzustellen.

Die ± 3 VK-Bereiche, die bei der Präzisionsbewertung als Referenzbereich dienen, sind in diesen Diagrammen als gestrichelte horizontale Linien dargestellt.

3.1 Messungen Routinelabor

Nachfolgend sind die Ergebnisdiagramme für die Messgrößen der Routinediagnostik Kalium, Glucose, Harnstoff, Harnsäure, Ferritin, Albumin, IgG, Gamma-GT, Lipase, Cholesterin, Triglyceride, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, non-HDL-Cholesterin und Cystatin C im Serum dargestellt.

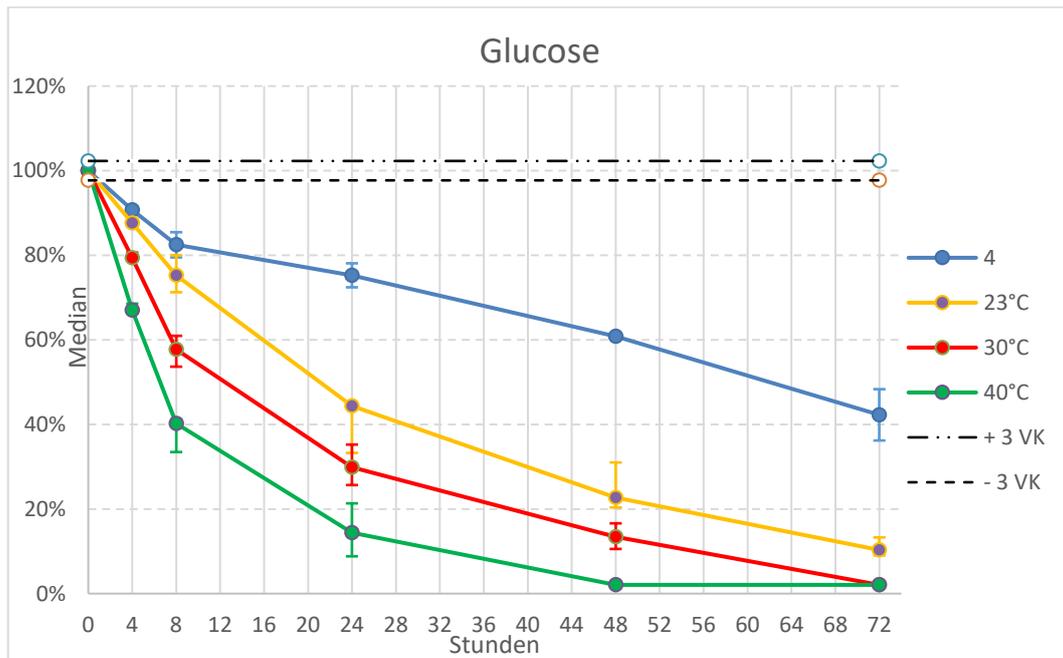
Kalium: Stabil bei 23 °C für 24 h, bei 30 °C für 4 h und bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumaufbereitung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 114% | 136% | 198% | 238% | 238% |
| 23°C | | 105% | 105% | 102% | 148% | 205% |
| 30°C | | 95% | 90% | 126% | 238% | 238% |
| 40°C | | 102% | 131% | 238% | 238% | 238% |

Abbildung 4: Kalium, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

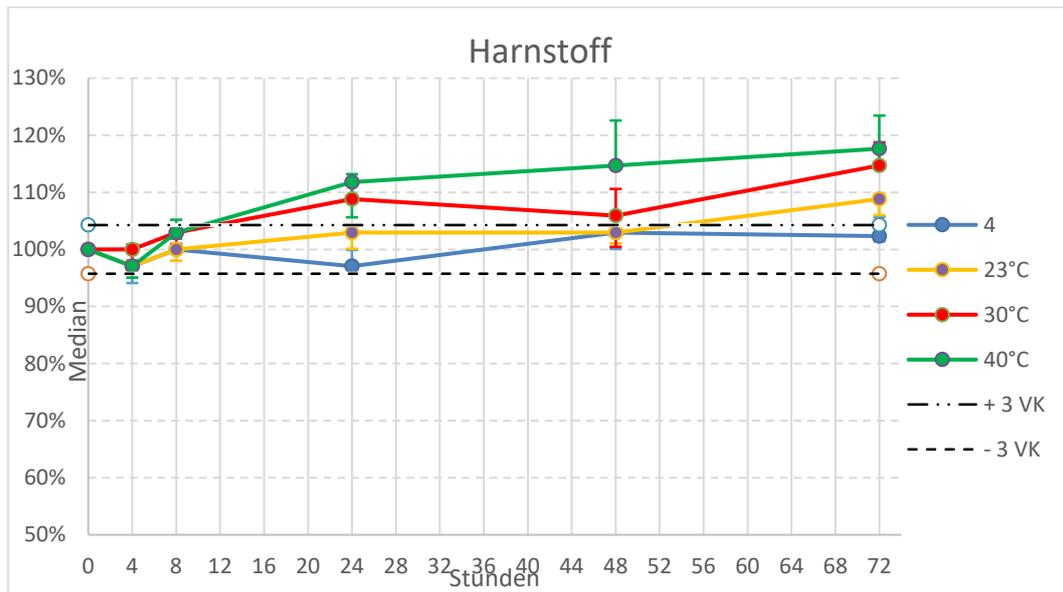
Glucose: Für Glucose konnte in den beobachteten Messzeiträumen und bei den verschiedenen Messtemperaturen keine Stabilität in Vollblutproben zur Serumherstellung nachgewiesen werden.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 4°C | | 91% | 82% | 75% | 61% | 42% |
| 23°C | | 88% | 75% | 44% | 23% | 10% |
| 30°C | | 79% | 58% | 30% | 13% | 2% |
| 40°C | | 67% | 40% | 14% | 2% | 2% |

Abbildung 5: Glucose, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

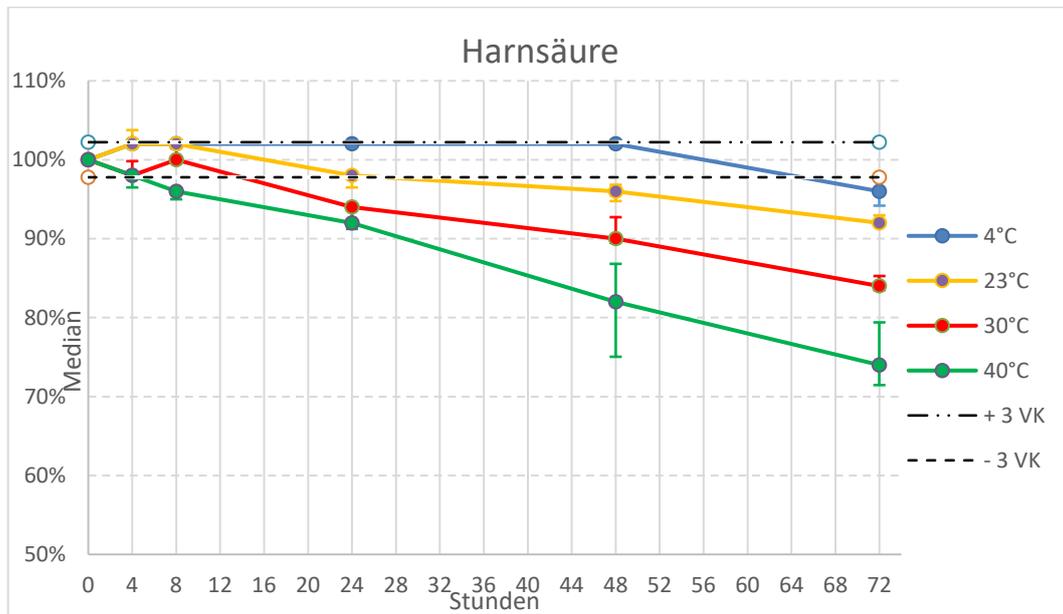
Harnstoff: Stabil bei 4 °C für 72 h, bei 23 °C für 48 h, bei 30 °C und 40 °C jeweils stabil für 8 h in Vollblutproben zur Serumaufbereitung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 97% | 100% | 97% | 103% | 102% |
| 23°C | | 97% | 100% | 103% | 103% | 109% |
| 30°C | | 100% | 103% | 109% | 106% | 115% |
| 40°C | | 97% | 103% | 112% | 115% | 118% |

Abbildung 6: Harnstoff, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

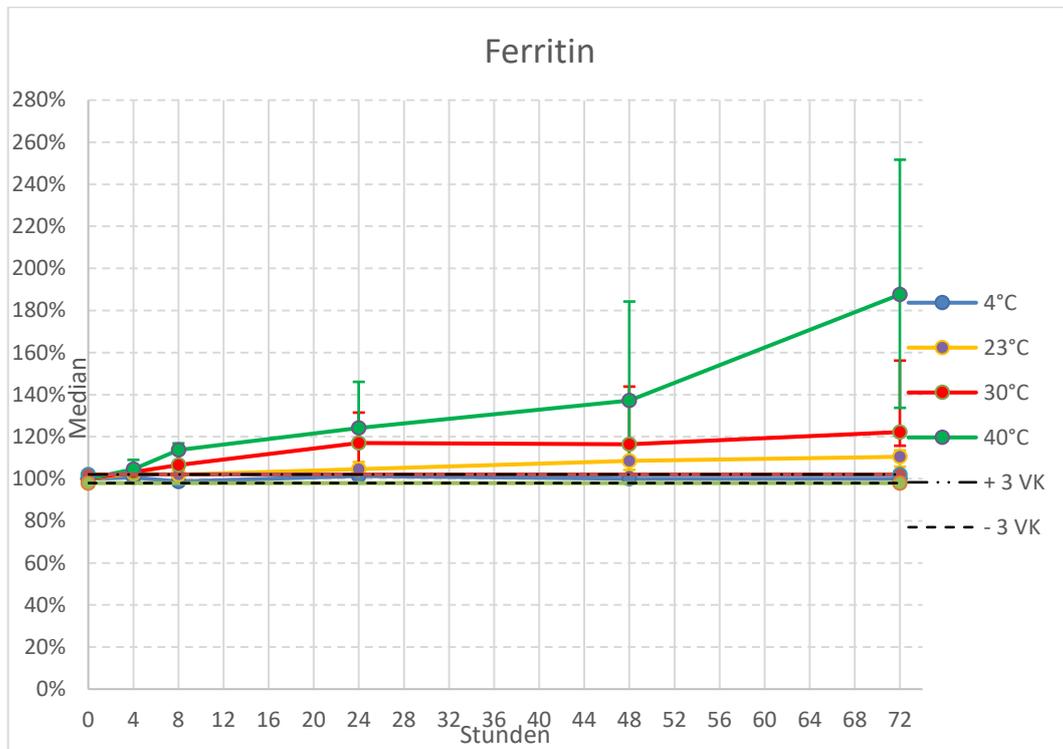
Harnsäure: Stabil bei 4 °C für 48 h, bei 23 °C für 24 h, bei 30 °C für 8 h und bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Herstellung von Serum.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|-----|
| 4°C | | 102% | 102% | 102% | 102% | 96% |
| 23°C | | 102% | 102% | 98% | 96% | 92% |
| 30°C | | 98% | 100% | 94% | 90% | 84% |
| 40°C | | 98% | 96% | 92% | 82% | 74% |

Abbildung 7: Harnsäure, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs. Quelle: (30)

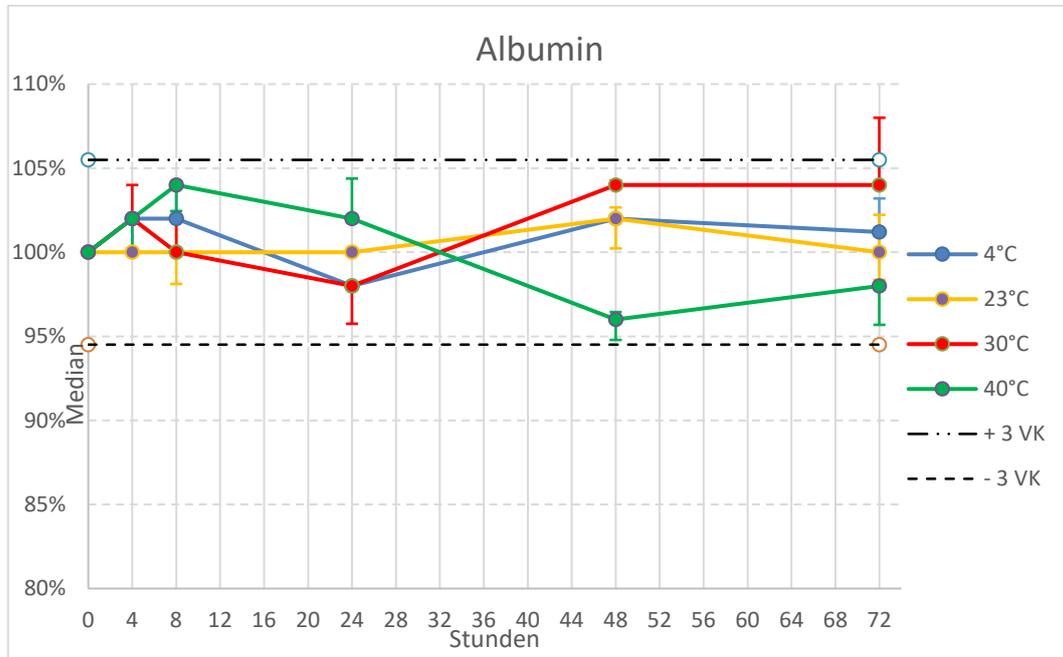
Ferritin: Stabil bei 4 °C für 72 h, bei 23 °C für 8 h in Vollblutproben für die Serumaufbereitung und nicht stabil bei 30 °C oder darüber.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 101% | 99% | 101% | 100% | 100% |
| 23°C | | 102% | 102% | 105% | 108% | 110% |
| 30°C | | 103% | 107% | 117% | 116% | 122% |
| 40°C | | 105% | 114% | 124% | 137% | 188% |

Abbildung 8: Ferritin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs. Quelle: (30)

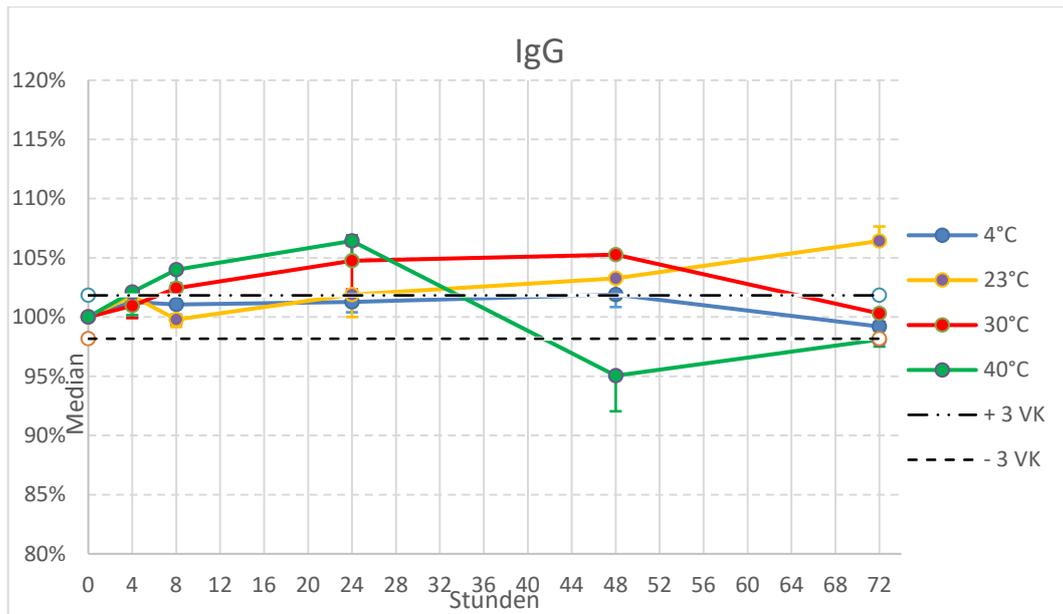
Albumin: Stabil zwischen 4 °C und 40 °C für 72 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 102% | 102% | 98% | 102% | 101% |
| 23°C | | 100% | 100% | 100% | 102% | 100% |
| 30°C | | 102% | 100% | 98% | 104% | 104% |
| 40°C | | 102% | 104% | 102% | 96% | 98% |

Abbildung 9: Albumin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

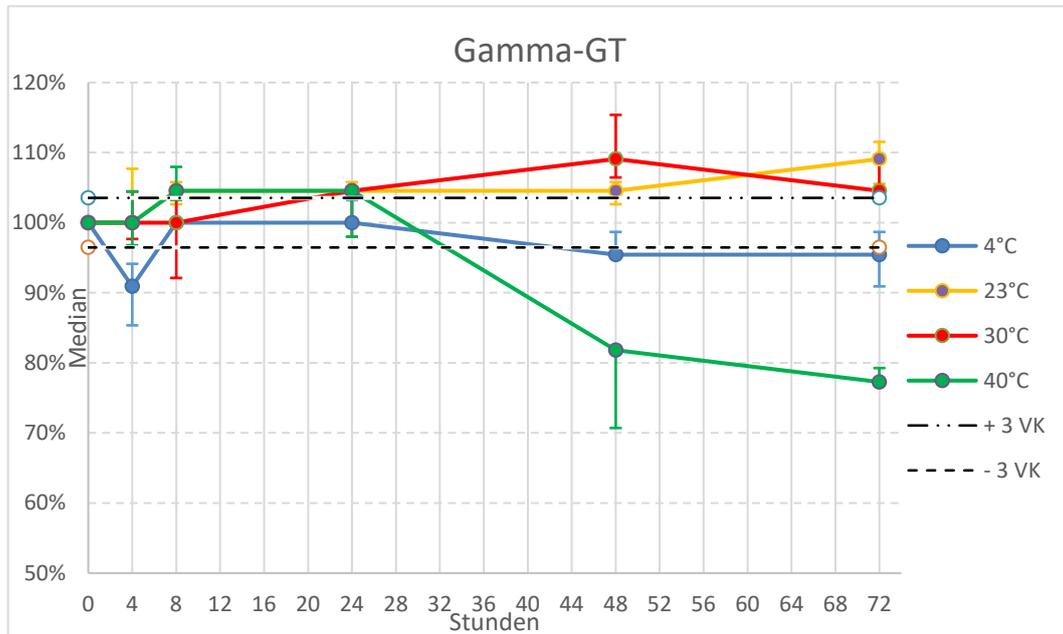
IgG: Stabil bei 4 °C für 24 h und bei 72 h, bei 23 °C für 8 h, bei 30 °C für 4 h und für 72 h, jedoch nicht bei höheren Temperaturen in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 101% | 101% | 101% | 102% | 99% |
| 23°C | | 102% | 100% | 102% | 103% | 106% |
| 30°C | | 101% | 102% | 105% | 105% | 100% |
| 40°C | | 102% | 104% | 106% | 95% | 98% |

Abbildung 10: IgG, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

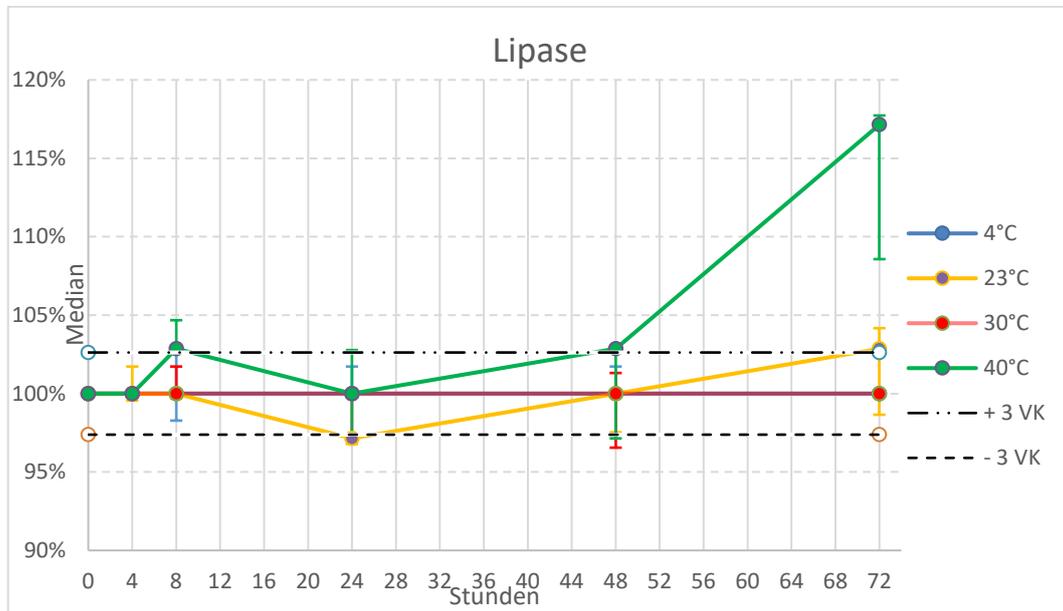
Gamma-GT: Stabil bei 4 °C zwischen 8 h und 24 h, bei 23 °C für 4 h, bei 30 °C für 8 h und bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 91% | 100% | 100% | 95% | 95% |
| 23°C | | 100% | 105% | 105% | 105% | 109% |
| 30°C | | 100% | 100% | 105% | 109% | 105% |
| 40°C | | 100% | 105% | 105% | 82% | 77% |

Abbildung 11: Gamma-GT, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

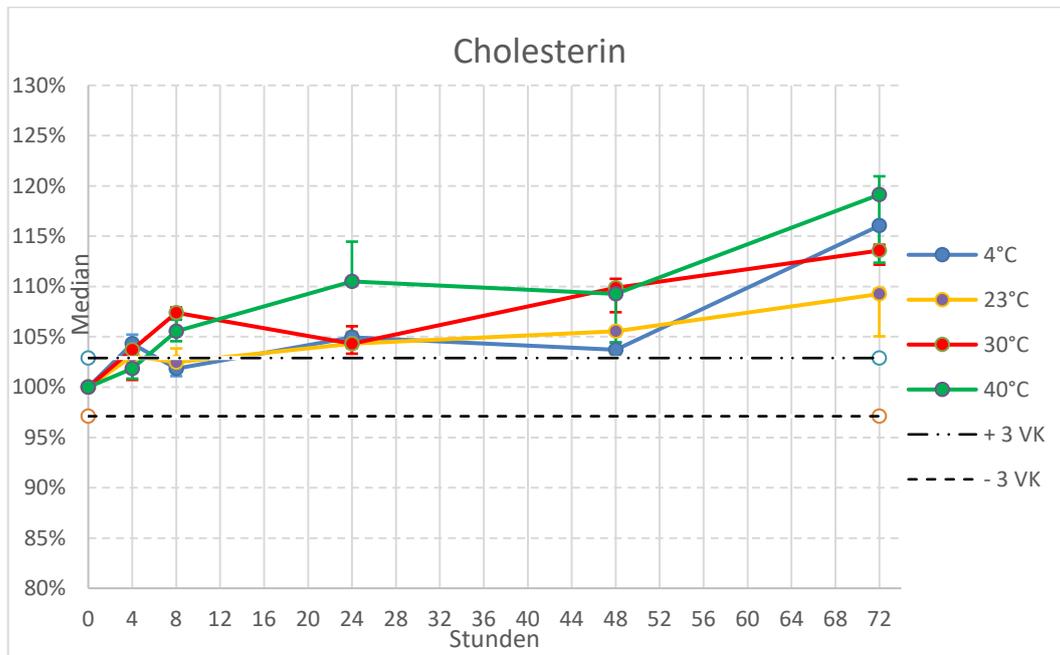
Lipase: Stabil bei 4 °C und 30 °C für 72 h, bei 23 °C für 8 h und 48 h, bei 40 °C für 4 h und 24 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 23°C | | 100% | 100% | 97% | 100% | 109% |
| 30°C | | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 40°C | | 100% | 103% | 100% | 103% | 117% |

Abbildung 12: Lipase, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

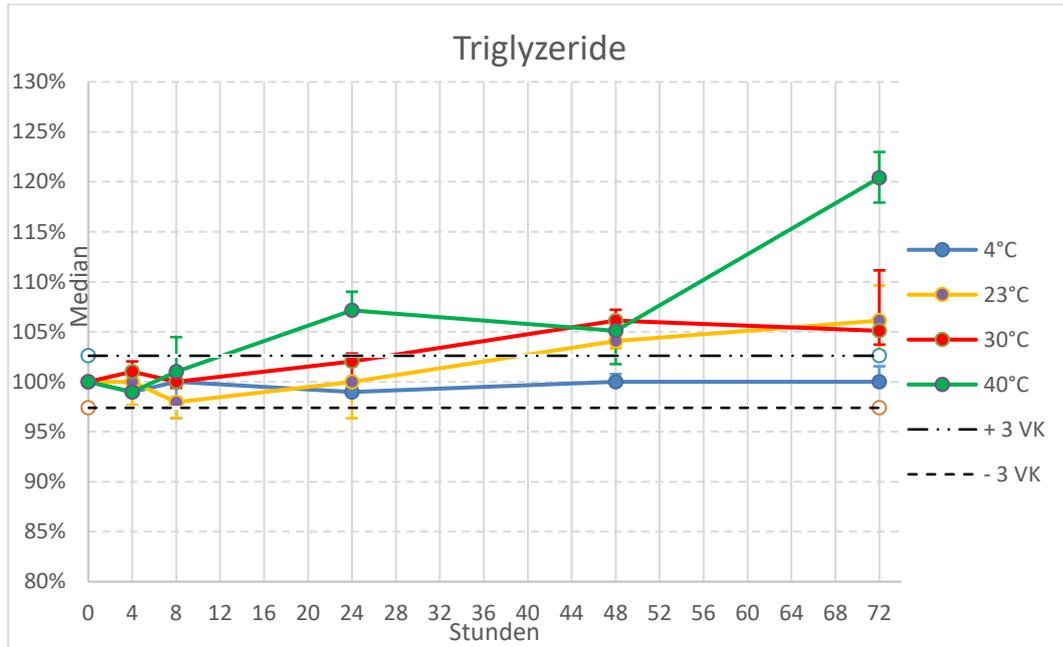
Cholesterin: Stabil bei 4 °C und 23 °C zum Zeitpunkt 8 h, bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 104% | 102% | 105% | 104% | 116% |
| 23°C | | 103% | 102% | 104% | 106% | 109% |
| 30°C | | 104% | 107% | 104% | 110% | 114% |
| 40°C | | 102% | 106% | 110% | 109% | 119% |

Abbildung 13: Cholesterin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

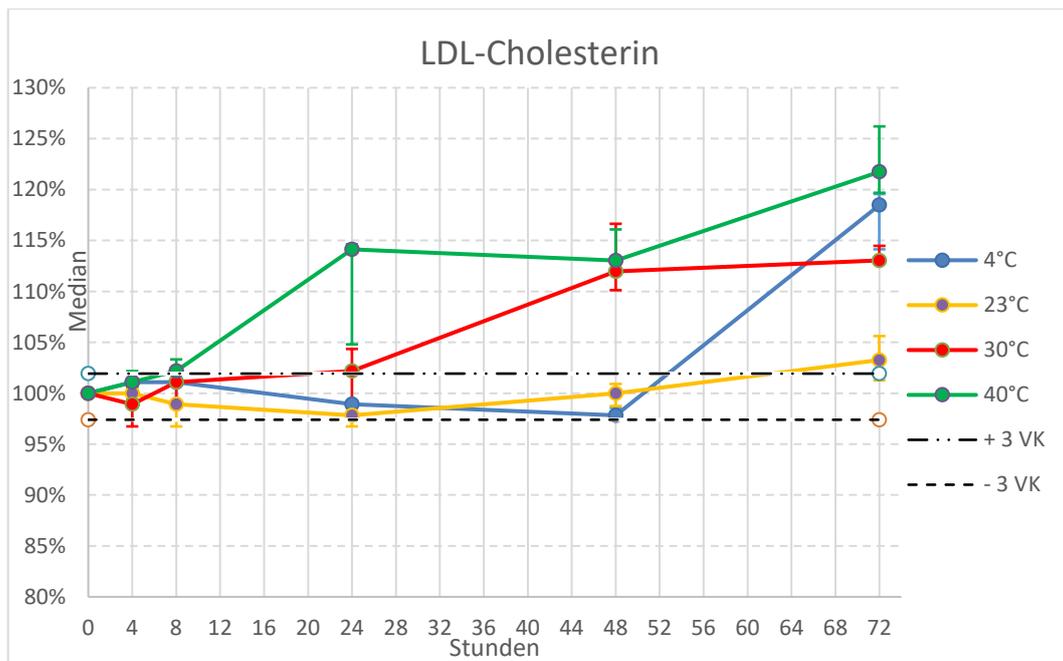
Triglyceride: Stabil bei 4 °C für 72 h, bei 23 °C und 30 °C für 24 h und bei 40 °C für 8 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% |
| 23°C | | 100% | 98% | 100% | 104% | 106% |
| 30°C | | 101% | 100% | 102% | 106% | 105% |
| 40°C | | 99% | 101% | 107% | 105% | 120% |

Abbildung 14: Triglyceride, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontale gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

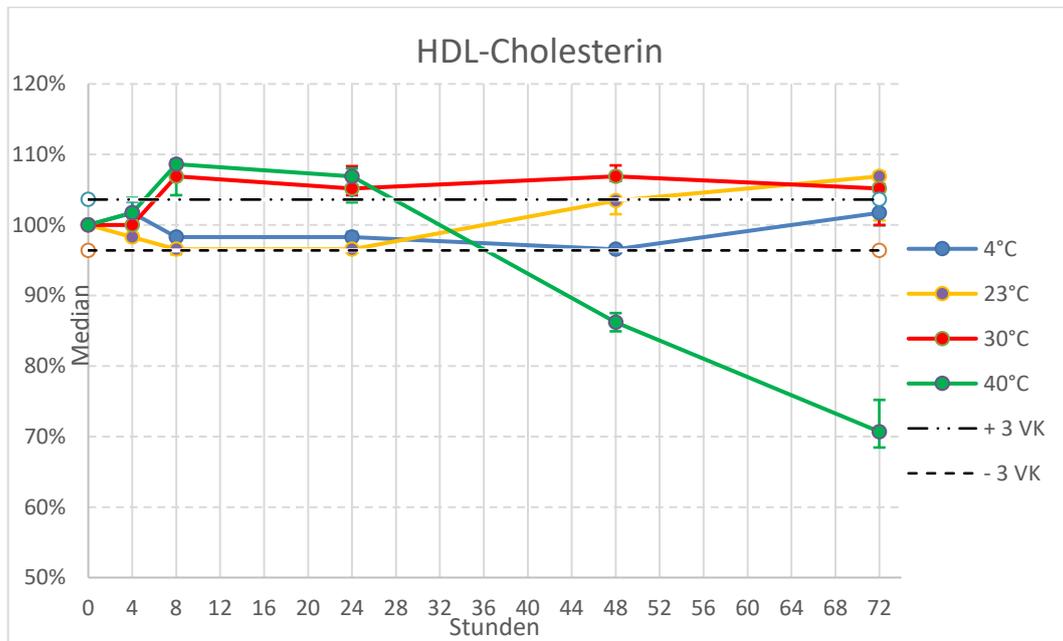
LDL-Cholesterin: Stabil bei 4 °C für 24 h, bei 23 °C für 8 h und zum Messzeitpunkt nach 48 h, bei 30 °C für 8 h und bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 101% | 101% | 99% | 98% | 118% |
| 23°C | | 100% | 99% | 98% | 100% | 103% |
| 30°C | | 99% | 101% | 102% | 112% | 113% |
| 40°C | | 101% | 102% | 114% | 113% | 122% |

Abbildung 15: LDL-Cholesterin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

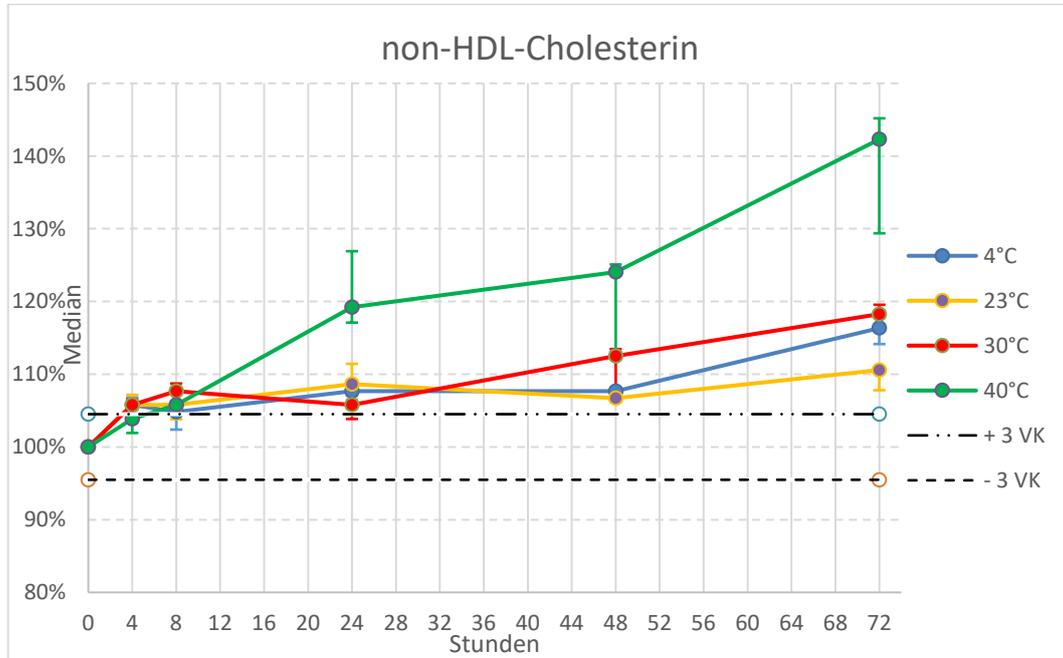
HDL-Cholesterin: Stabil bei 4 °C für 72 h, bei 23 °C für 48 h, bei 30 °C und 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 102% | 98% | 98% | 97% | 102% |
| 23°C | | 98% | 97% | 97% | 103% | 107% |
| 30°C | | 100% | 107% | 105% | 107% | 105% |
| 40°C | | 102% | 109% | 107% | 86% | 71% |

Abbildung 16: HDL-Cholesterin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

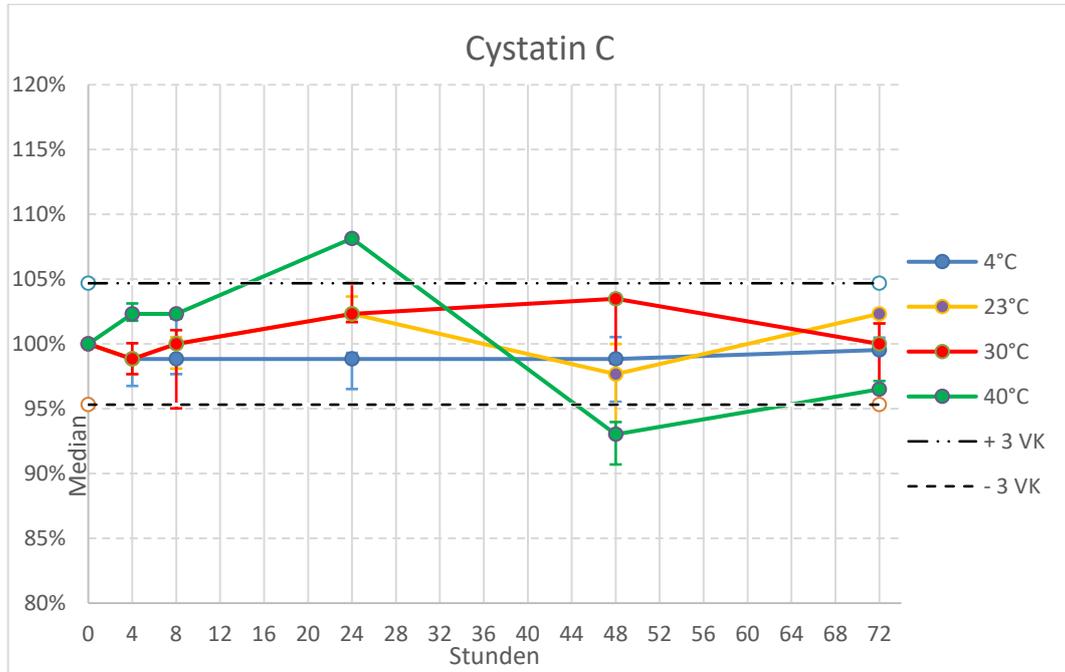
Non-HDL-Cholesterin: Stabil bei 40 °C für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 106% | 105% | 108% | 108% | 116% |
| 23°C | | 106% | 106% | 109% | 107% | 111% |
| 30°C | | 106% | 108% | 106% | 113% | 118% |
| 40°C | | 104% | 106% | 119% | 124% | 142% |

Abbildung 17: non-HDL-Cholesterin, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

Cycstatin C: Stabil bei 4 °C, 23 °C und 30 °C für 72 h, bei 40 °C für 8 h und zum Messzeitpunkt nach 72 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



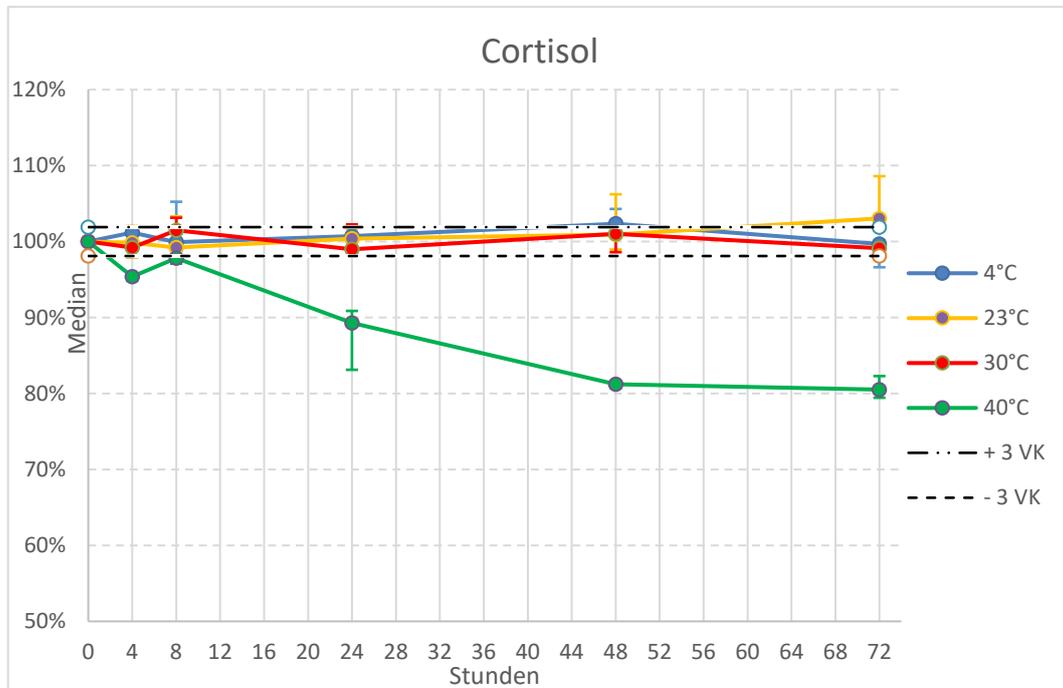
| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% |
| 23°C | | 99% | 100% | 102% | 98% | 102% |
| 30°C | | 99% | 100% | 102% | 103% | 100% |
| 40°C | | 102% | 102% | 108% | 93% | 97% |

Abbildung 18: Cycstatin C, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

3.2 Messungen Massenspektrometrie

Nachfolgend sind die Ergebnisdiagramme für die Messgrößen der Massenspektrometrie Cortisol, Cortison, 11-Deoxycortisol, Corticosterone, DHEA, DHT, Testosteron, 17-OH-Progesterone, 11-DOC, Androstenedione, Aldosterone und DHEAS im Serum dargestellt.

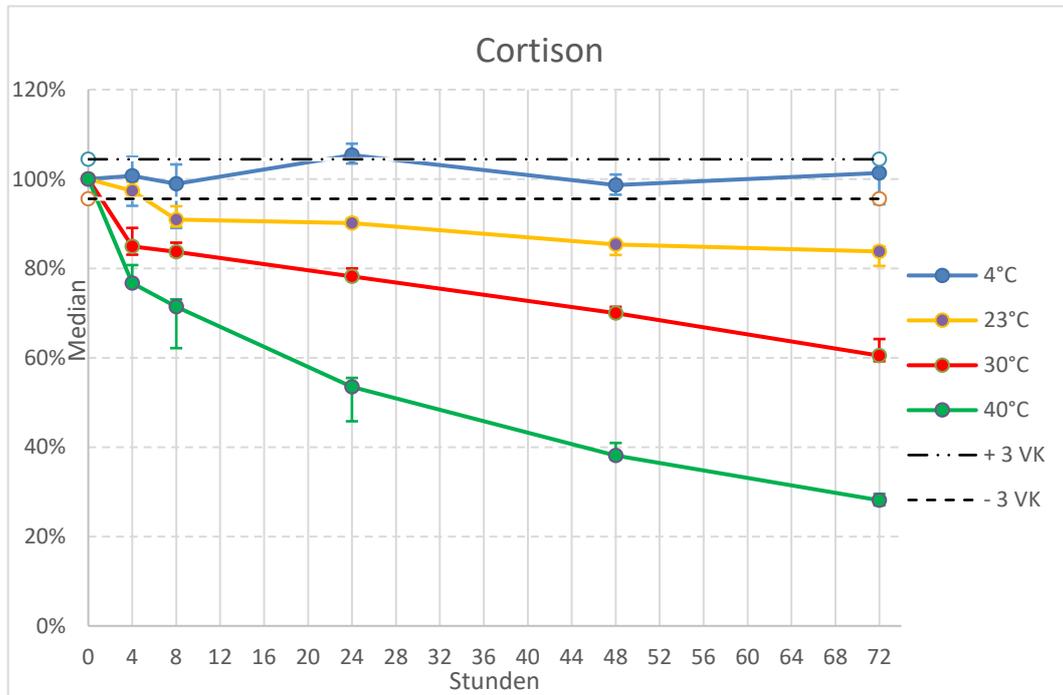
Cortisol: Stabil bei 4 °C für 24 h und ein Ergebnis innerhalb der MU nach 72 h. Bei 23 °C für 48 h und bei 30 °C für 72 h stabil in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 101% | 100% | 101% | 102% | 100% |
| 23°C | | 100% | 99% | 100% | 101% | 103% |
| 30°C | | 99% | 101% | 99% | 101% | 99% |
| 40°C | | 95% | 98% | 89% | 81% | 81% |

Abbildung 19: Cortisol, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

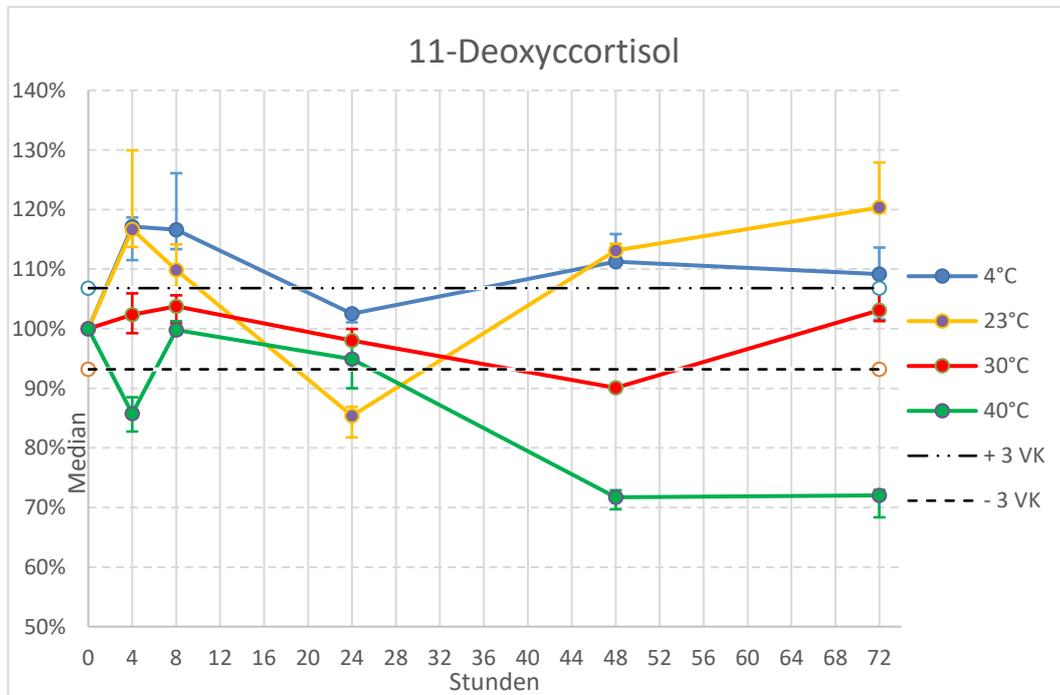
Cortison: Stabil bei 4 °C für 8 h und zwischen 48 h und 72 h. Bei 23 °C stabil für 4 h gemessen in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|-----|------|-----|------|
| 4°C | | 101% | 99% | 105% | 99% | 101% |
| 23°C | | 97% | 91% | 90% | 85% | 84% |
| 30°C | | 85% | 84% | 78% | 70% | 60% |
| 40°C | | 77% | 71% | 54% | 38% | 28% |

Abbildung 20: Cortison, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

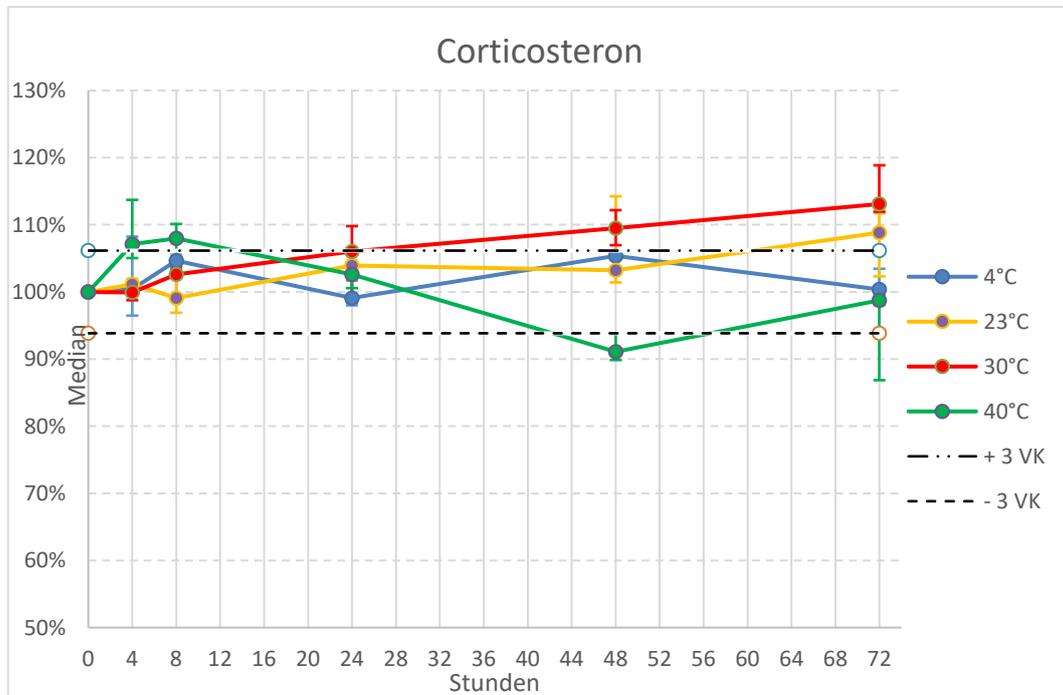
11-Deoxycortisol: Stabil bei 4 °C zum Zeitpunkt 24 h, bei 30 °C für 24 h und zum Messzeitpunkt 72 h. Bei 40 °C zwischen 8 h und 24 h stabil in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 117% | 117% | 103% | 111% | 109% |
| 23°C | | 117% | 110% | 85% | 113% | 120% |
| 30°C | | 102% | 104% | 98% | 90% | 103% |
| 40°C | | 86% | 100% | 95% | 72% | 72% |

Abbildung 21: 11-Deoxycortisol, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

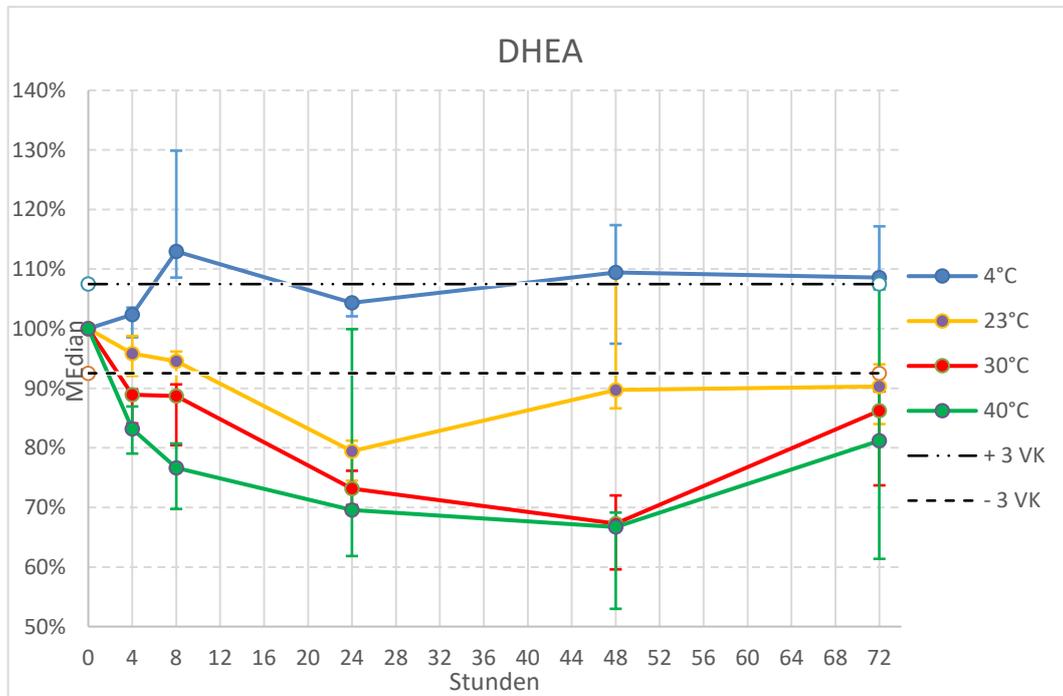
Corticosteron: Bei 4 °C stabil für 72 h bei 23 °C für 48 h bei 30 °C für 24 h. Bei 40 °C ergab sich nach 24 h und 72 h ein Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 100% | 105% | 99% | 105% | 100% |
| 23°C | | 101% | 99% | 104% | 103% | 109% |
| 30°C | | 100% | 103% | 106% | 109% | 113% |
| 40°C | | 107% | 108% | 103% | 91% | 99% |

Abbildung 22: Corticosteron, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

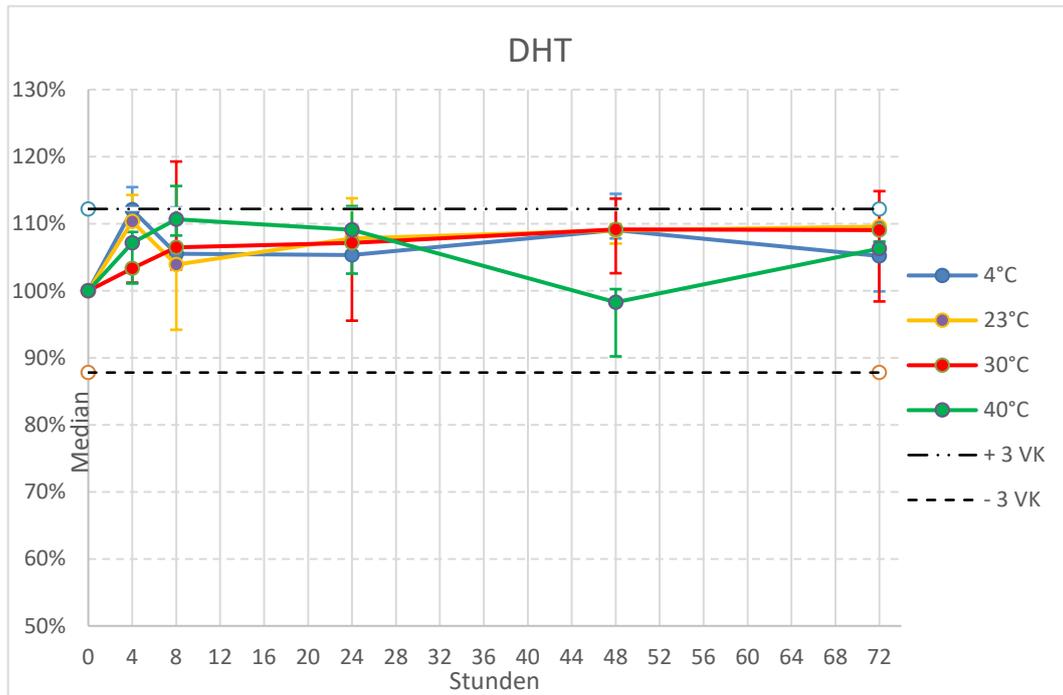
DHEA: Bei 4 °C stabil für 4 h und ein Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit nach 24 h. Bei 23 °C stabil für 8 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 102% | 113% | 104% | 109% | 109% |
| 23°C | | 96% | 95% | 79% | 90% | 90% |
| 30°C | | 89% | 89% | 73% | 67% | 86% |
| 40°C | | 83% | 77% | 70% | 67% | 81% |

Abbildung 23: DHEA, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

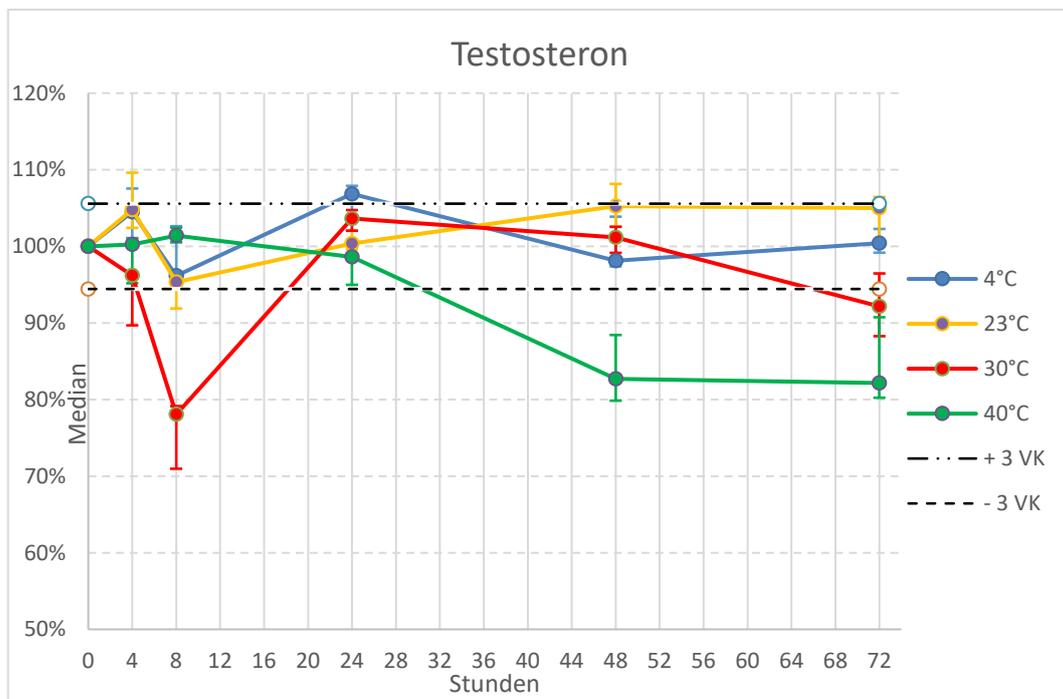
DHT: Bei 4 °C, 23 °C, 30 °C und 40 °C stabil für 72 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 112% | 106% | 105% | 109% | 105% |
| 23°C | | 110% | 104% | 108% | 109% | 110% |
| 30°C | | 103% | 106% | 107% | 109% | 109% |
| 40°C | | 107% | 111% | 109% | 98% | 106% |

Abbildung 24: DHT, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

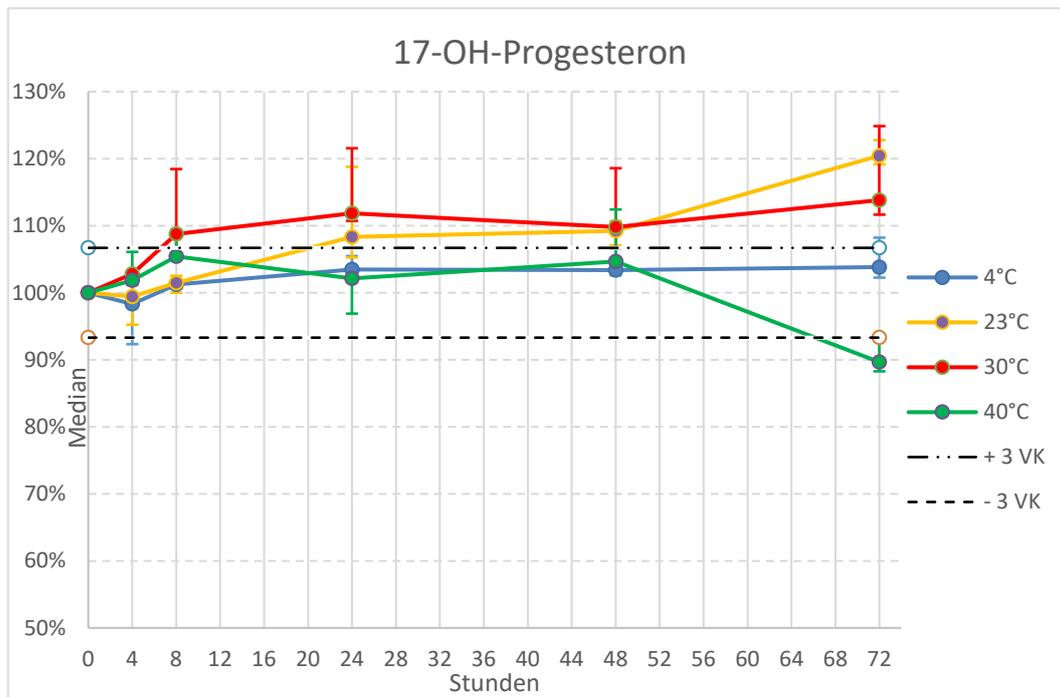
Testosteron: Bei 4 °C stabil für 8 h und innerhalb der Messunsicherheit zwischen 48 h und 72 h. Bei 23 °C stabil für 72 h. Bei 30 °C stabil für 4 h und innerhalb der Messunsicherheit zwischen 24 h und 48 h. Bei 40 °C stabil für 24 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 105% | 96% | 107% | 98% | 100% |
| 23°C | | 105% | 95% | 100% | 105% | 105% |
| 30°C | | 96% | 78% | 104% | 101% | 92% |
| 40°C | | 100% | 101% | 99% | 83% | 82% |

Abbildung 25: Testosteron, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

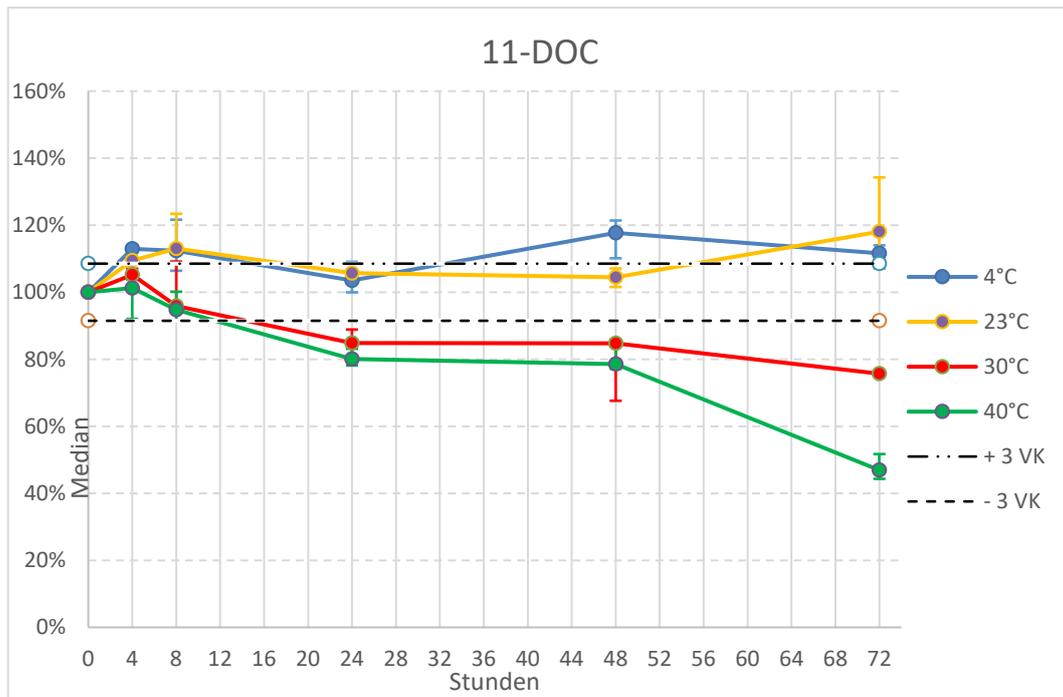
17-OH-Progesteron: Bei 4 °C stabil für 72 h, bei 23 °C für 8 h, bei 30 °C für 4 h und bei 40 °C für 48 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 98% | 101% | 103% | 103% | 104% |
| 23°C | | 99% | 101% | 108% | 109% | 120% |
| 30°C | | 103% | 109% | 112% | 110% | 114% |
| 40°C | | 102% | 105% | 102% | 105% | 90% |

Abbildung 26: 17-OH-Progesteron, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

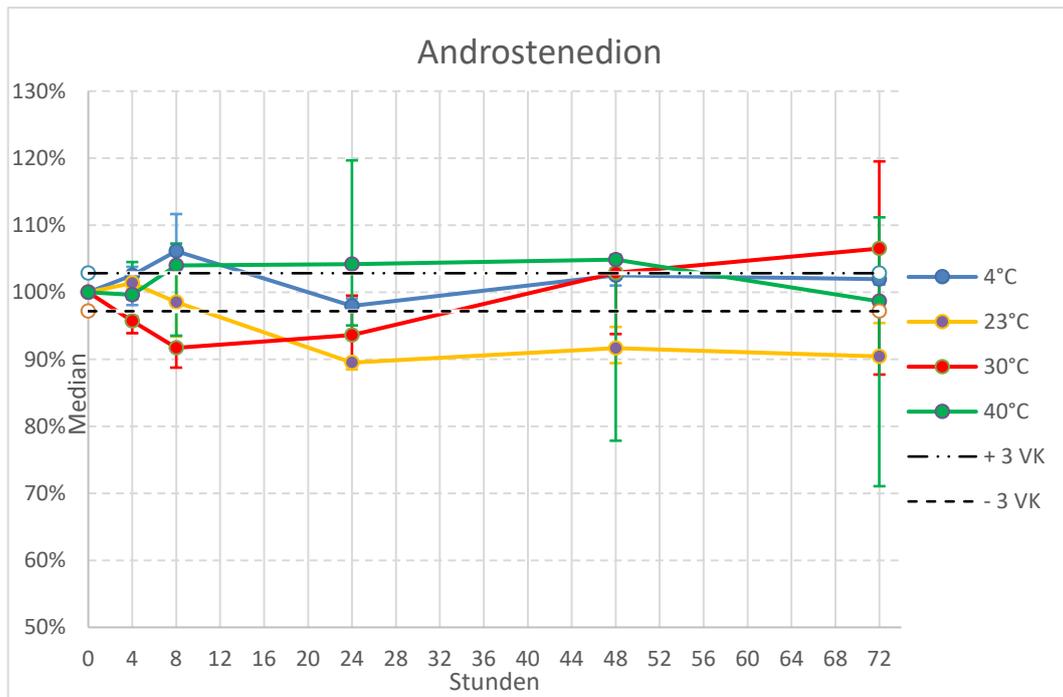
11-DOC: Bei 4 °C Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit bei 24 h, bei 23 °C Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit zwischen 24 h und 48 h. Bei 30 °C und 40 °C stabil für 8 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 113% | 112% | 104% | 118% | 112% |
| 23°C | | 109% | 113% | 106% | 104% | 118% |
| 30°C | | 105% | 96% | 85% | 85% | 76% |
| 40°C | | 101% | 95% | 80% | 79% | 47% |

Abbildung 27: 11-DOC, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

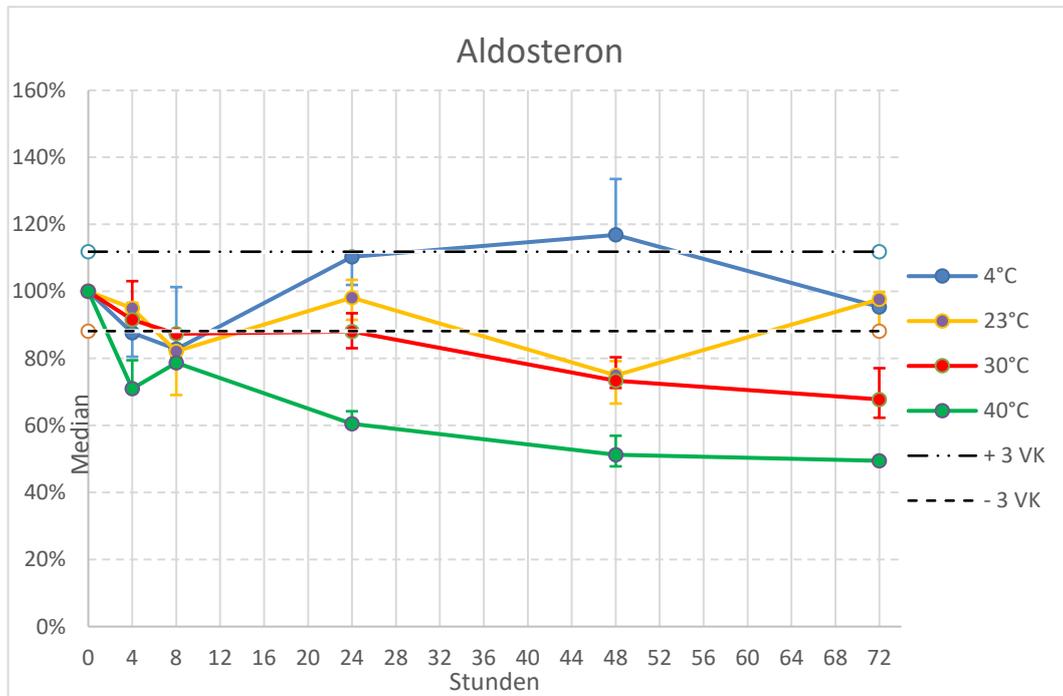
Androstenedion: Bei 4 °C stabil für 4 h und Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit zwischen 24 h und 72 h. Bei 23 °C stabil für 8 h, bei 40 °C stabil für 4 h und Messergebnis innerhalb der Messunsicherheit bei 72 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| 4°C | | 103% | 106% | 98% | 103% | 102% |
| 23°C | | 101% | 99% | 89% | 92% | 90% |
| 30°C | | 96% | 92% | 94% | 103% | 107% |
| 40°C | | 100% | 104% | 104% | 105% | 99% |

Abbildung 28: Androstenedion, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

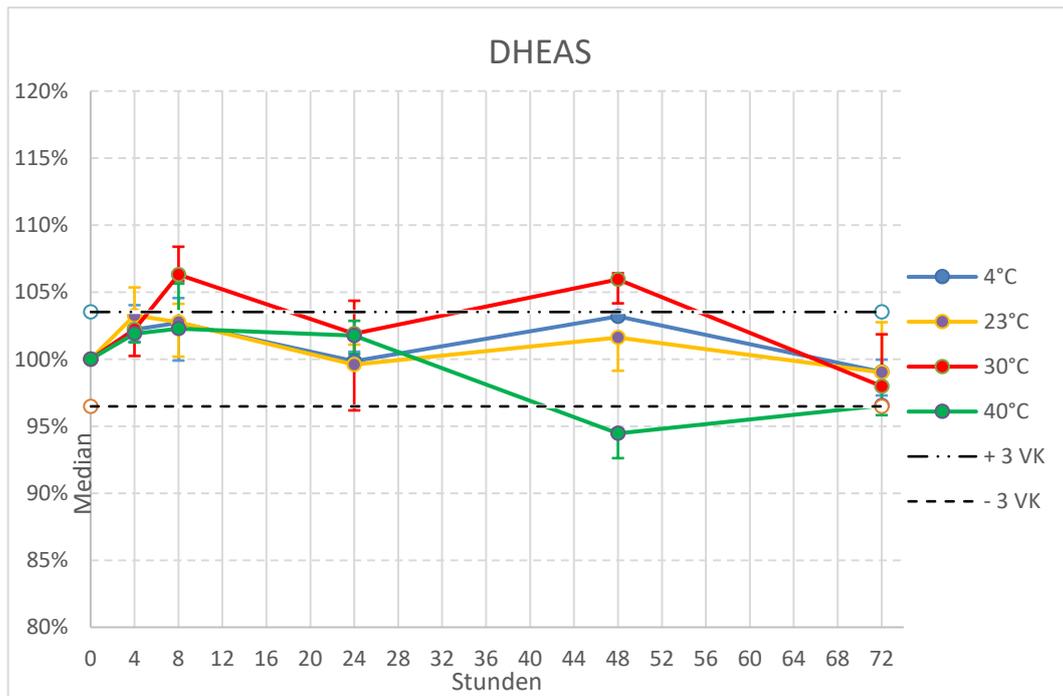
Aldosteron: Messergebnisse innerhalb der Messunsicherheit bei 4 °C nach 24 h und 72 h, bei 23 °C nach 4 h, 24 h und 72 h. Bei 30 °C stabil für 4 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|-----|-----|------|------|-----|
| 4°C | | 88% | 83% | 110% | 117% | 95% |
| 23°C | | 95% | 82% | 98% | 75% | 98% |
| 30°C | | 92% | 87% | 88% | 73% | 68% |
| 40°C | | 71% | 79% | 60% | 51% | 49% |

Abbildung 29: Aldosteron, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

DHEAS: Bei 4 °C und 23 °C stabil für 72 h, bei 30 °C stabil für 4 h und Messergebnisse innerhalb der Messunsicherheit nach 24 h und 72 h. Bei 40 °C stabil 24 h und Messergebnisse innerhalb der Messunsicherheit nach 72 h in Vollblutproben zur Serumherstellung.



| Temp. | Zeit | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
|-------|------|------|------|------|------|-----|
| 4°C | | 102% | 103% | 100% | 103% | 99% |
| 23°C | | 103% | 103% | 100% | 102% | 99% |
| 30°C | | 102% | 106% | 102% | 106% | 98% |
| 40°C | | 102% | 102% | 102% | 94% | 97% |

Abbildung 30: DHEAS, Median der prozentualen Veränderungen der Messergebnisse gegenüber dem Ausgangswert, die für einzelne Vollblutproben von fünf Freiwilligen, die für verschiedene Zeitintervalle bei bestimmten Temperaturen gelagert wurden, mit den jeweiligen Interquartilsbereichen. Horizontal gestrichelte Linien zeigen die approximativ ermittelte Messunsicherheit des Messverfahrens an. Die eingefügte Tabelle zeigt die mittlere prozentuale Abweichung vom Ausgangswert; grün = innerhalb des MU-Bereichs; rot = außerhalb des MU-Bereichs.

3.3 Messungen Übersichtstabelle

Gemäß dem Bewertungsprotokoll (*Tabelle 3*) sind alle Messwerte als Übersichtsabbildung dargestellt, die zu einem bestimmten Messzeitpunkt innerhalb der geschätzten Messunsicherheit lagen bzw. diese über- oder unterschritten. (*Abbildung 31*).

| Analyt | 4 °C | | | | | 23°C | | | | | 30°C | | | | | 40°C | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
| Kalium | Red | Red | Red | Red | Red | Green | Green | Green | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| Glucose | Red |
| Harnstoff | Green | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Green | Red | Red | Red |
| Harnsäure | Green | Green | Green | Green | Red | Green | Green | Green | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| Ferritin | Green | Green | Green | Green | Green | Red | Green | Red |
| Albumin | Green |
| IgG | Green | Green | Green | Red | Green | Green | Green | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Red |
| Gamma GT | Red | Green | Green | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Green | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| Lipase | Green | Red | Red | Red | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Red | Green | Red | Red |
| Cholesterin | Red | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| Triglyzeride | Green | Red | Red | Green | Green | Green | Red | Red | Green | Green | Red | Red | Red |
| LDL | Green | Green | Green | Red | Red | Green | Green | Red | Green | Green | Green | Green | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| HDL | Green | Red | Red | Red | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| non-HDL | Red | Green | Red | Red | Red | Red |
| Cysc C | Green | Red | Red | Red | Green |

| Analyt | 4 °C | | | | | 23°C | | | | | 30°C | | | | | 40°C | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
| Cortisol | grün | grün | grün | rot | grün | grün | grün | grün | grün | rot | grün | grün | grün | grün | grün | rot | rot | rot | rot | rot |
| Cortison | grün | grün | rot | grün | grün | grün | rot |
| 11-Deoxycortisol | rot | rot | grün | rot | grün | grün | grün | rot | grün | rot | grün | grün | rot | rot |
| Corticosterone | grün | rot | grün | grün | grün | rot | rot | rot | rot | rot | rot | grün |
| DHEA | grün | rot | grün | rot | rot | grün | grün | rot |
| DHT | grün |
| Testosterone | grün | grün | rot | grün | grün | grün | grün | grün | grün | rot | grün | rot | grün | grün | rot | grün | grün | grün | rot | rot |
| 17-OH-Progesterone | grün | rot | rot | rot | grün | rot | rot | rot | rot | grün | grün | grün | grün | rot |
| 11-DOC | rot | rot | grün | rot | rot | rot | rot | grün | grün | rot | grün | grün | rot | rot | rot | grün | grün | rot | rot | rot |
| Androstenedione | grün | rot | grün | grün | grün | grün | grün | rot | grün | rot | rot | rot | grün |
| Aldosterone | rot | rot | grün | rot | grün | grün | rot | grün | rot | grün | grün | rot |
| DHEAS | grün | rot | rot | grün | rot | grün | grün | grün | grün | rot | grün |

Abbildung 31: Stabilitätsübersicht der untersuchten Analyten zu den untersuchten Zeiten und Temperaturen; grün: Der Analyt befindet sich zur definierten Zeit und Temperatur innerhalb des approximativ ermittelten Messunsicherheitsbereichs und wird für diese Bedingungen als stabil gewertet, rot: Der Analyt befindet sich zur definierten Zeit und Temperatur außerhalb des approximativ ermittelten Messunsicherheitsbereichs und wird für diese Bedingungen als instabil gewertet.

4. Diskussion

Als eine Momentaufnahme des menschlichen Körpers stellt gewonnenes Probenmaterial ein äußerst komplexes und dynamisches System dar, in dem eine Vielzahl von bio-chemischen Reaktionen ablaufen. Somit unterliegt dieser Ausschnitt einer stetigen Veränderung, auch außerhalb des Körpers.

Gegenstand dieser Arbeit war die Beleuchtung der präanalytischen Phase dieses komplexen Gesamtprozesses und im Speziellen die Untersuchung der Transportstabilität.

Es handelt sich bei dieser Arbeit um ein allgemeines Protokoll für Stabilitätsstudien im Zusammenhang mit der präanalytischen Handhabung von diagnostischen Proben. Im Speziellen wird ein isochrones Schema in einer zweidimensionalen Matrix aus Inkubationszeit und Temperatur angewendet. Die Berücksichtigung der Messunsicherheit bei der Bewertung der Ergebnisse ist für dieses Protokoll von zentraler Bedeutung. Die Anwendbarkeit des Ansatzes wurde in einer exemplarischen Proof-of-Concept-Studie bewiesen. Hierbei wurde eine große Menge an relevanten Daten im Verlauf eines vollständig durchgeführten standardisierten Experimentes erhoben.

4.1 Interpretation

Das vorgeschlagene Protokoll bietet einen Rahmen, innerhalb dessen die Schlüsselparameter variiert werden können und ist daher eher deskriptiv als präskriptiv. Es ermöglicht die umfassende und detaillierte Beschreibung von Stabilitätsprofilen.

Die Variablen bei der Anwendung des Testschemas können je nach Untersuchungsschwerpunkt und Fragestellung unterschiedlich festgelegt werden. Bei der Untersuchung eines relevanten Stabilitätsprofils für einen krankenhausinternen Transport wird sich die Wahl der Testvariablen signifikant von denen unterscheiden, die als Prüfvariablen für einen internationalen Transport zu einem Einsendelabor betrachtet werden. Das hier vorgeschlagene Schema ist flexibel genug, um all diese unterschiedlichen Anforderungen abbilden zu können. Es ist ebenfalls anwendbar auf die Untersuchung der Lagerstabilität von Proben, die bereits in einem Labor verarbeitet und zurückgestellt sind. Wenn eine Temperatur von 4 °C in einer Transportumgebung aufrechterhalten werden kann, ist eine Untersuchung z. B. bei höheren Temperaturen nicht notwendig. Der hier vorgeschlagene Ansatz versucht ein umfassendes Bild über die zu erwartenden Normalbedingungen zu zeichnen. Veränderungen der Transport- oder Lagerungsbedingungen einer Probe können Auswirkungen auf die Testergebnisse haben. Diese wechselnden oder auch statischen Bedingungen sollten bei der Erstellung der Untersuchungsvariablen berücksichtigt werden.

Die statistische Auswertung der Messwerte nach dem vorgeschlagenen Schema ist grundsätzlich variabel und unterschiedliche Vorgehensweisen sind denkbar. Der für die durchgeführte Proof-of-Concept-Anwendung beschriebene Ansatz ist einfach und pragmatisch. Er beinhaltet die Schätzung einer Messunsicherheit aus Wiederholungsmessungen auf einfache Weise als ± 3 -VK-Bereich.

Wenn der Median der gesammelten Messungen für einen Untersuchungspunkt eine größere Abweichung aufweist als durch die geschätzte Messunsicherheit erklärt werden kann, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass eine signifikante Transport- oder Lagerungsinstabilität des Analyten vorliegt. Statistisch strengere Verfahren als der hier verwendete pragmatische Ansatz können statistische Tests, Regressionsanalysen von Abklingkurven oder komplexere mathematische Modellierungen sein (15, 31); allerdings sind zeitabhängige Veränderungen nicht notwendigerweise linear oder monoton. Daher können die Algorithmen für eine umfassende Modellierung sehr komplex und spezifisch für den Analyten und die verwendeten analytischen Methoden sein, was gesamt betrachtet eine schlechte Praktikabilität aufweist.

Basierend auf den erhobenen Daten können potenzielle Instabilitätsphänomene aufgezeigt werden, die analytisch nachweisbar, aber aus medizinisch-diagnostischer Sicht noch tolerierbar sind. Tatsächliche

Akzeptanzkriterien sollten formuliert werden, die z. B. die biologische Variabilität eines Parameters nach dem Milan-Konzept berücksichtigen (32). Ein Beispiel hierfür ist, dass eine 3%ige Instabilität eines Parameters analytisch nachgewiesen werden kann, aber angesichts einer erheblichen biologischen Varianz des Parameters noch akzeptabel ist. So gelten beispielsweise für IgG-Konzentrationen im Blutserum bei Erwachsenen von 700 bis 1600 mg/dl als Normwerte. Hier ergibt sich aus einer 3%igen Instabilität eines Messwertes sehr wahrscheinlich keine medizinische Relevanz.

Ein weiteres Phänomen, welches sich in diesem Zusammenhang gezeigt hat, sind die nicht streng-monotonen Stabilitätsverläufe der Analyten. In der Ergebnisübersicht (*Abbildung 32*) ist zu erkennen, dass es nach potenzieller Instabilität eines Analyten für einen Inkubationszeitraum erneut zu einer potenziellen Stabilität bei längerer Inkubationszeit kommt. Am Beispiel der Lipase ist zu sehen, dass eine Stabilität für einen Zeitraum von 8h bei 23°C besteht. Die Untersuchung der Lipase für einen Inkubationszeitraum von 24h bei 23°C liefert nach den definierten Kriterien eine potenzielle Instabilität, jedoch ist für die Messung nach einer Inkubationszeit von 48h bei 23°C wieder eine potenzielle Stabilität nachweisbar. Die Überprüfung der Stabilität nach 72h bei 23°C ist wieder als potenziell instabil zu werten.

Die Definition der Stabilitätskriterien unter Berücksichtigung z. B. der medizinischen Relevanz zeigt sich als wichtige Fragestellung vor der Durchführung von Stabilitätsuntersuchungen, um möglichst hochwertig

interpretierbare Ergebnisse zu erhalten. Bei bi-direktionalen Messwertverläufen könnten engmaschigere Messzeitpunkte notwendig werden, um Muster potenzieller Stabilitätsunsicherheiten valider erkennen zu können. Aus diesen Erkenntnissen könnten im Verlauf auch mathematische Modelle erstellt oder angepasst werden.

Es ist wichtig, klar zwischen Transportstabilität und Lagerstabilität im Labor zu unterscheiden. Die Transportstabilität hat im Allgemeinen eine höhere praktische Relevanz. Dies gilt zum Beispiel für Regionen mit begrenzten Ressourcen und/oder großen Entfernungen, was zu längeren Transportzeiten führt. Dies gilt aber auch aufgrund der zunehmenden Zentralisierung von Labordienstleistungen in Ballungsräumen der Industrieländer. Die Lagerstabilität ist überwiegend relevant für die Nachforderungen von Analysen aus den bereits in einem Labor eingegangenen Proben. Es ist anzumerken, dass die Lagerstabilität im Labor trotz der eigentlich geringeren Relevanz dennoch den Schwerpunkt früherer Veröffentlichungen bildete.

Das vorliegende Protokoll steht im Einklang mit den EFLM Empfehlungen CRESS (24) und realisiert die in dieser Publikation geforderten Standards und Empfehlungen für das Vorgehen bei Stabilitätsuntersuchungen.

Es ist überraschend, dass es in der klinisch-chemischen Labordiagnostik internationale Standards für die Untersuchung der Stabilität von

Reagenzien gibt (26, 33), aber bislang keine entsprechenden Standards für die Untersuchung der präanalytischen Stabilität von Analyten im Vollblut. In einem früheren Artikel schlagen Gómes-Rioja et al. (34) ein grundlegendes Protokoll vor. Diese Arbeit könnte mit ihrem vergleichenden Ansatz einen Beitrag zur Entwicklung eines internationalen Standards für die Untersuchung der Probenstabilität darstellen. Hier sollte, einer umfassenderen Betrachtung folgend, der Aspekt der Variabilität und Anpassbarkeit einbezogen werden.

In der Pharmazie gibt es umfangreiches Fachwissen über die Untersuchung der Stabilität von Verbindungen (35, 36). Dazu gehören beschleunigte isochrone Studienprotokolle mit Abschätzung des Substanzzerfalls nach der Arrhenius-Gleichung. Dies bezieht sich auch auf Referenzmaterialien (37–39). Es ist jedoch zu betonen, dass das System einer Arzneimittelverbindung in einer hoch standardisierten galenischen Matrix weit weniger komplex ist als das einer Messgröße in einer biologischen Probenmatrix.

Eine interessante Beobachtung in den Daten war der Anstieg der Ferritinwerte bei längerer Einwirkung höherer Temperaturen. Eine mögliche Erklärung dafür könnten nicht spezifizierte Veränderungen in der Probenmatrix sein, die sich auf die Ligandenbindungsmessung auswirken, obwohl die molare Konzentration des Analytenmoleküls gleichbleibt. Verschiedene Effekte können hier sogar zusammenwirken, d. h. der Zerfall des Analyten sowie mögliche dynamische Matrixeffekte, einschließlich Hämolyse.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Stabilität der Parameter von den jeweiligen Messmethoden abhängig sein kann; zum Beispiel, wenn sich Epitope und Tertiärstrukturen in Bezug auf Ligandenbindungsassays ändern.

Die Produktinformation des Herstellers des exemplarisch verwendeten Harnsäure-Assays geht nicht auf die Stabilität der Messgröße in Vollblutproben vor der Zentrifugation ein. Es wird nur die Stabilität in Serum und Plasma beschrieben (Roche Dokument 005171857190c701V11.0). Darin heißt es: *“It is the responsibility of the individual laboratory to use all available references and/or its own studies to determine specific stability criteria for its laboratory.”*

Für den Ferritin-Assay wird nur die "Stabilität" angegeben, ohne Angabe des Materials (Vollblut oder Serum). Sie wird mit 7 Tagen bei 15-25 °C und 7 Tagen bei 2-8 °C beschrieben. Weitere Empfehlungen werden nicht gegeben (Roche-Dokument 0105172390190c701V7.0).

Eine Beobachtung im Rahmen dieser Untersuchungen ist damit auch, dass die Stabilitätsangaben der Testhersteller sehr vage sein können. Es scheint, dass die diagnostische Industrie mehr Aufmerksamkeit auf die Empfehlung von Assay bezogenen Stabilitätseigenschaften legen sollte.

Neben dem traditionellen Ansatz der Quantifizierung eines einzelnen Ziels wird die Erstellung von Stabilitätsprofilen wahrscheinlich eine noch

wichtigere Rolle in der Ära der Omics-Anwendungen in der Labormedizin (40) spielen - was transparente und flexible Protokolle erforderlich macht.

4.2 Limitationen der Arbeit

Natürlich unterliegt das in dieser Arbeit vorgeschlagene Protokoll Limitationen.

Die Stabilitätseigenschaften von Messgrößen können sich möglicherweise bei nicht-gesunden Personen von denen gesunder Probanden unterscheiden. Allerdings unterliegt die Probenentnahme von Patienten für Stabilitätsstudien unter ethischen Gesichtspunkten sehr engen Grenzen. In einer Studie an gesunden Probanden wird es damit grundsätzlich nur möglich sein, die Stabilitätsprofile von Messgrößen in physiologischen Konzentrationsbereichen zu beschreiben.

Dieses Schema ist nur für Testmaterialien anwendbar, die eingefroren werden können; daher ist das Schema insbesondere für hämatologische Untersuchungen nicht geeignet.

Außerdem werden in jedem Fall nur Stichproben untersucht, um Vorhersagen für zukünftige Proben zu treffen. Daher sind Aussagen zur Stabilität der untersuchten Analyten Wahrscheinlichkeitsaussagen, denn einzelne Proben können sich unvorhersehbar verhalten. Ausreißer der Stabilitätsuntersuchungen sind möglich, da Untersuchungskollektive nicht willkürlich groß gewählt werden können.

Die Annahme einer Messunsicherheit ist grundsätzlich unscharf, auch weil es kaum möglich ist, Daten für den gesamten Messbereich zu erheben. Grundsätzlich ist die Bestimmung des Maßes (MU) immer fehlerbehaftet und erlaubt nur eine ungefähre Vorhersage der tatsächlichen Varianz in

einer zukünftigen Messreihe. Darüber hinaus ist zu beachten, dass ein realer Stichprobenversandprozess ein inkonstantes Temperaturprofil aufweisen kann, das nicht in diesem Protokoll abgebildet ist. Beispielsweise können Aufbewahrungszeiten bis zum Transportbeginn innerhalb einer Arztpraxis oder einem Abholcontainer entstehen, die sich von den Rahmenbedingungen während des Transportvorgangs unterscheiden. Auch der Transportvorgang kann mit Temperaturschwankungen verbunden sein wie z. B. Sonneneinstrahlung, die ein Transportauto während des Transportes aufheizen könnte.

Bei dem vorgestellten Schema werden sehr kleinvolumige Röhrchen verwendet, um den Bedarf an Spenderblut zu minimieren. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Stabilitätsergebnisse von der Größe der Probenröhrchen abhängen und dass Abweichungen bei Röhrchen mit Standardgröße auftreten können.

In der vorliegenden Proof-of-Concept-Untersuchung wurde der Einfluss von UV-Bestrahlung und Erschütterungen der Probe nicht untersucht. Dies kann jedoch prinzipiell auch mit dem vorgeschlagenen isochronen Basisverfahren (z. B. durch Inkubation auf einem horizontalen Schüttler) durchgeführt und simuliert werden. Diese Möglichkeit der flexiblen Anpassung von Studienparametern hat bis dato Novität.

4.3 Ausblick

Normen entstehen auf Basis eines Konsenses. Dies heißt, es entsteht eine Einigung über die konkreten Inhalte einer Norm unter Berücksichtigung der Interessen aller Beteiligten und unter Berücksichtigung des Standes der Technik.

Trotz aller Einschränkungen kann das hier vorgestellte flexible Protokoll ein nützliches Instrument sein, um die Stabilität von Messgrößen zu untersuchen und einrichtungsspezifische Leitlinien für Untersuchungen zu entwickeln. Dies könnte zukünftig dazu beitragen, dass alle Stabilitätsstudien auf denselben hochwertigen standardisierten Daten basieren und sich die Entwicklung eines nationalen oder sogar internationalen Standards relevanter Organisationen wie dem Deutschen Institut für Normung e.V. (DIN) oder der Internationalen Organisation für Normung (ISO) ergibt.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Laboruntersuchungen sind ein wichtiges Instrument zur Krankheitsdiagnostik und Kontrolle des Therapieerfolgs, wobei die Schnelligkeit der Bearbeitung des Probenmaterials sowie die Genauigkeit bzw. Validität der Laborergebnisse entscheidend sind.

Diagnostische Proben werden während des Transports zu Laboratorien einem Spektrum von Variablen ausgesetzt. Daher ist die Bewertung eines umfassenden Stabilitätsprofils von Messgrößen gerechtfertigt. Während für Pharmazeutika und Reagenzien angemessene Teststandards festgelegt wurden, ist dies bei diagnostischen Proben nicht der Fall. Ziel dieser Arbeit war es, ein Protokoll zu entwickeln und zu bewerten, das auf diagnostische Proben anwendbar ist.

Methoden: Das vorgeschlagene Schema besteht aus vier Schlüsselementen. Erstens, für die Bewertung der detaillierten Transport- oder Lagerstabilitätsprofile werden die Proben einem Spektrum von spezifizierten Temperaturen und Lagerungsdauern ausgesetzt. Zweitens, einem isochronen Protokoll, das die Vorbereitung mehrerer identischer Probenaliquoten für die Lagerung bei -80 °C erfordert. Drittens, wird zur Untersuchung der Transportstabilität von Vollblut-Primärproben für jede Temperatur/Expositionsdauer-Kombination ein separates Primärprobenröhrchen gewonnen und exponiert. Hierfür wurden Primärprobenbehälter mit reduziertem Volumen angewendet. Viertens, die Ergebnisse der Analyse werden unter

Berücksichtigung der Messunsicherheit der verwendeten Analysemethoden bewertet.

Alle Variablen des Experiments werden in einer standardisierten Matrix dokumentiert. Als Proof-of-Concept wurden die Stabilitätsmuster einer Reihe von Messgrößen bei vier Temperaturniveaus über diverse Zeiträume bis hin zu 72 Stunden in primären Serumprobenröhrchen profiliert.

Ergebnisse: Das Protokoll erwies sich als praktikabel und ermöglichte die Beschreibung eines umfassenden Stabilitätsprofils einer beträchtlichen Anzahl von Verbindungen, basierend auf 21 kleinvolumigen Primärproben, die von jedem freiwilligen Probanden gesammelt und gemäß diesem Protokoll exponiert wurden. Teile dieser Arbeit wurden in der Publikation „Transport stability profiling – a proposed generic protocol“ (30) veröffentlicht.

Fazit: Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Beleuchtung der präanalytischen Phase eines komplexen Systems bio-chemischer Reaktionen sowie auf die Untersuchung der Transportstabilität. Es handelt sich um ein allgemeines Protokoll für Stabilitätsstudien in Bezug auf die präanalytische Handhabung diagnostischer Proben. Die Machbarkeit des Ansatzes wurde in einer exemplarischen Proof-of-Concept-Studie demonstriert, in der eine große Menge relevanter Daten im Rahmen eines standardisierten Experiments erhoben wurden. Mit diesem einfachen und praktikablen isochronen Protokoll können die Auswirkungen unterschiedlicher Vorverarbeitungsbedingungen auf die Stabilität von Messgrößen in Primärproben während des Transports zu diagnostischen Laboren detailliert untersucht werden. Dies

ist von Bedeutung, da die präanalytische Logistik mit der Zentralisierung analytischer Dienstleistungen immer wichtiger wird.

Die Möglichkeit der flexiblen Anpassung von Studienparametern innerhalb des Stabilitätsstudienprotokolls hat bis dato Novität. Dieses flexible Protokoll ist ein nützliches Instrument zur Bewertung der Stabilität von Messgrößen und zur Entwicklung spezifischer Richtlinien für Untersuchungen. Es könnte dazu beitragen, dass alle Stabilitätsprüfungen auf denselben Standards beruhen und dass durch Organisationen wie das DIN oder die ISO relevante Normen entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Bezirksregierung Köln, Abteilung 5: Umwelt und Arbeitsschutz. Versand diagnostischer Proben; 2018.
2. Vogeser M. Statistische Strukturdaten zur medizinischen Labordiagnostik in Deutschland – Statusbericht 2022. GMS Zeitschrift zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien. 2022; 13.
3. Sabine Löffert MD. Die Bedeutung der Labordiagnostik für die Krankenhausversorgung. 2014. Abrufbar unter der URL: https://www.dki.de/sites/default/files/2019-05/bedeutung_der_labordiagnostik.pdf. 2022;
4. Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH. LB Unternehmensbericht 2020; 2021. Abrufbar unter der URL: https://www.laborberlin.com/wp-content/uploads/2021/07/LB_Unternehmensbericht_Web_200x260_150ppi_sRGB.pdf. 2022;
5. Proben zwischen Patient und Labor: Der Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Qualität von Laboratoriumsbefunden. 2., überarb. Aufl. Darmstadt: GIT Verl.; 2000.
6. Wu D-W, Li Y-M, Wang F. How Long can we Store Blood Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. EBioMedicine. 2017; 24:277–85. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28965875/>.
7. Sciacovelli L, Panteghini M, Lippi G, Sumarac Z, Cadamuro J, Galoro CADO et al. Defining a roadmap for harmonizing quality indicators in Laboratory Medicine: a consensus statement on behalf of the IFCC Working Group "Laboratory Error and Patient Safety" and EFLM Task and Finish Group "Performance specifications for the extra-analytical phases". Clinical chemistry and laboratory medicine. 2017; 55(10):1478–88.
8. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2006; 44(4):358–65.
9. Patel MK, El-Khoury JM, Simundic A-M, Farnsworth CW, Broell F, Genzen JR et al. Evolution of Blood Sample Transportation and Monitoring Technologies. Clinical chemistry. 2021; 67(6):812–9.

10. Zaninotto M, Tasinato A, Padoan A, Vecchiato G, Pinato A, Sciacovelli L et al. An integrated system for monitoring the quality of sample transportation. *Clinical biochemistry*. 2012; 45(9):688–90. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22394462/>.
11. Zaninotto M, Tasinato A, Padoan A, Vecchiato G, Pinato A, Sciacovelli L et al. Effects of sample transportation on commonly requested laboratory tests. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012; 50(10):1755–60. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23089704/>.
12. Walter M, Wiltfang J, Vogelgsang J. Pre-Analytical Sampling and Storage Conditions of Amyloid- β Peptides in Venous and Capillary Blood. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2020; 78(2):529–35. Abrufbar unter der URL: https://www.researchgate.net/publication/347156733_Pre-Analytical_Sampling_and_Storage_Conditions_of_Amyloid-b_Peptides_in_Venous_and_Capillary_Blood.
13. Hedayati M, Razavi SA, Boroomand S, Kheradmand Kia S. The impact of pre-analytical variations on biochemical analytes stability: A systematic review. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2020; 34(12):e23551. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32869910/>.
14. Gao J, Ulvik A, McCann A, Ueland PM, Meyer K. Microheterogeneity and preanalytical stability of protein biomarkers of inflammation and renal function. *Talanta*. 2021; 223(Pt 1):121774. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33303176/>.
15. Gómez Rioja R, Martínez Espartosa D, Segovia M, Ibarz M, Llopis MA, Bauça JM et al. Laboratory sample stability. Is it possible to define a consensus stability function? An example of five blood magnitudes. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018; 56(11):1806–18. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29729140/>.
16. Henriksen LO, Faber NR, Moller MF, Nexø E, Hansen AB. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and transport of human whole blood at 21°C. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2014; 74(7):603–10. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24988314/>.

17. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical biochemistry*. 2012; 45(6):464–9. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285385/>.
18. Zwart SR, Wolf M, Rogers A, Rodgers S, Gillman PL, Hitchcox K et al. Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. *Clinical biochemistry*. 2009; 42(9):907–10. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250930/>.
19. Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Annals of clinical biochemistry*. 2008; 45(Pt 4):375–9. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18583622/>.
20. Young DS. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. Published in 1997 in Washington DC) by AACC press. 1997. Abrufbar unter der URL: <https://lib.ugent.be/en/catalog/rug01:000423285>.
21. Jane Ellis M, Livesey JH, Evans MJ. Hormone stability in human whole blood. *Clinical biochemistry*. 2003; 36(2):109–12. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12633759/>.
22. Boyanton BL, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clinical chemistry*. 2002; 48(12):2242–7. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12446483/>.
23. van Diemen JJK, Fuijkschot WW, Spit K, van Reuler AVR, Bonten TN, Numans ME et al. Influence of pre-analytical time and temperature conditions on serum thromboxane B2 levels. *Thrombosis Research*. 2018 [zuletzt geprüft am 29.11.2020]; 163:1–5.
24. Cornes M, Simundic A-M, Cadamuro J, Costelloe SJ, Baird G, Kristensen GBB et al. The CRESS checklist for reporting stability studies: on behalf

of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2020; 59(1):59–69. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32710715/>.

25. Ana-Maria Simundic, Nora Nikolac, Walter Guder. Preanalytical variation and preexamination processes. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer C, Tietz NW, Herausgeber. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 6th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. S. 81–120 Abrufbar unter der URL: https://www.researchgate.net/publication/322144476_Preanalytical_variation_and_preexamination_processes.

26. CLSI. EP25A Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. Wayne, PA, USA: CLSI; 2009.

27. FDA/CDER/Lars Michael Flores. Controlled Correspondence Related to Generic Drug Development Guidance for Industry; 2015 [zuletzt geprüft am 29.11.2020]. Abrufbar unter der URL: <https://www.fda.gov/media/89456/download>.

28. ICH. Q1A(R2) Guideline: ICH; 2003 [zuletzt geprüft am 29.11.2020]. Abrufbar unter der URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>.

29. ICH. Q1E Guideline: ICH; 2003 [zuletzt geprüft am 29.11.2020]. Abrufbar unter der URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1E%20Guideline.pdf>.

30. Willems L, Paal M, Vogeser M. Transport stability profiling - a proposed generic protocol. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2022; 60(7):995–1002. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35499915/>.

31. Pum JKW. Evaluating sample stability in the clinical laboratory with the help of linear and non-linear regression analysis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2020; 58(2):188–96. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31702996/>.

32. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, Oosterhuis W, Plebani M, Sandberg S. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clinical chemistry and*

laboratory medicine. 2017; 55(12):1849–56. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29031018/>.

33. International Standardization Organization. ISO 23640:2015 In vitro diagnostic medical devices – evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. Geneva: International Standardization Organization; 2015.

34. Gómez-Rioja R, Segovia Amaro M, Diaz-Garzón J, Bauçà JM, Martínez Espartosa D, Fernández-Calle P. A protocol for testing the stability of biochemical analytes. Technical document. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2019; 57(12):1829–36. Abrufbar unter der URL: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0586/html?lang=de>.

35. World Health Organization. Pharmaceuticals Unit. WHO guidelines on stability testing of pharmaceutical products containing well-established drug substances in conventional dosage forms: World Health Organization; 2012 Jun 17 WHO/PHARM/94.565/rev.1. Unpublished. Abrufbar unter der URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/62169>.

36. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry – Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. Rockville, MD, USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; 2003.

37. LAMBERTY A, SCHIMMEL H. The Study of the Stability of Reference Materials by "Isochronous" Measurements; 1997. Abrufbar unter der URL: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC14850>.

38. Ammann D, Becker R, Nehls I. Stability of ethyl glucuronide in hair reference materials after accelerated aging. Forensic science international. 2015; 257:337–40. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26476175/>.

39. Linsinger TP, Pauwels J, Lamberty A, Schimmel HG, van der Veen AM, Siekmann L. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. Fresenius' journal of analytical chemistry. 2001; 370(2-3):183–8. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451233/>.

40. Ghini V, Abuja PM, Polasek O, Kozera L, Laiho P, Anton G et al. Metabolomic Fingerprints in Large Population Cohorts: Impact of Preanalytical Heterogeneity. *Clinical chemistry*. 2021; 67(8):1153–5. Abrufbar unter der URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34223627/>.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit aber auch in meiner Studienzeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Vogeser für die ausgezeichnete Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich zudem Herrn Dr. med. univ. Dr. rer. nat. Miachel Paal, PhD und meinen Geschwistern Petra, Cornelia und Dagmar für die Durchsicht dieser Arbeit und die konstruktiven Rückmeldungen Danke sagen.

Meinen Eltern Richard und Brigitte und meinem Onkel Erich sowie meiner Tante Elisabeth danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Willems, Lars

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Transportstabilitätsprofilung – Entwicklung eines Testprotokolls

.....

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27.06.2024

Lars Willems

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel:

Willems L, Paal M, Vogeser M. Transport stability profiling - a proposed generic protocol. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2022; 60(7):995–1002.