

III ASSAY-OPTIMIERUNG

Schnelle, effektive Validierung in der ELISA-Analytik

Dr. Tobias Polifke, Dr. Peter Rauch, CANDOR Bioscience GmbH

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)-Tests werden vielseitig eingesetzt, von der Forschung bis zur Routine – so etwa in der medizinisch-pharmazeutischen Forschung oder der Diagnostik. Einfache Grundregeln eröffnen dabei Einsparpotentiale in der Praxis der Assay-Validierung. Eine ELISA-Validierung ist stets Voraussetzung, um die Assays einsetzen zu können. In der Praxis kann für den Entwickler die Umsetzung von Richtlinien zur Validierung jedoch zu mit hohem Zeitaufwand und Kosten verbundenen Problemen führen. Dies hat sich mittlerweile in vielen Pharmafirmen bei der Umsetzung der „Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation (2001)“ der FDA gezeigt.

Der Umfang der Validierung lässt sich mittels der Richtlinie im Prinzip einfach ermitteln. Doch bereits die Forderung, zur Stabilitätsuntersuchung des Analyten eine „interference-free biological matrix“ einzusetzen, verlangt Erfahrung in der Assayentwicklung und Biologie, speziell um eine gute und wirtschaftliche Auswahl zu treffen. Auch straffe und effiziente Validierungen können zu Zeit- und Kostenproblemen führen, wenn sie aufgrund von Änderungen des Assays wiederholt durchlaufen werden müssen. Diese Wiederholungen sind bei jeder Veränderung des Assays zwingend erforderlich – gleichgültig ob es sich um Anpassungen von Inkubationszeiten oder Veränderungen der ELISA-Platte, der Antikörper oder Puffer handelt. Je später die Notwendigkeit der Änderung erkannt wird, desto höher der Kosteneffekt. Dauerhaft konstante Materialeigenschaften lassen sich wirtschaftlich sinnvoll meist nur durch Zukauf bei zertifizierten Herstellern erreichen, wenn diese neben der Chargenkontrolle auch die langfristige Verfügbarkeit unveränderter Produkte hoher Qualität garantieren. Der analytische Einsatz von ELISAs in präklinischen und klinischen Studien erfordert zwingend den dauerhaften Zugriff auf unveränderte Produkte. Nicht ohne Grund verlangt beispielsweise GLP den Einkauf bei zertifizierten Zulieferern (etwa ISO 9001:2000). Erneute Validierung aufgrund von Materialveränderung kann also vermieden werden.

Ein weiteres Problem sind sogenannte Interferenzen. Zu den häufigsten Ursachen für das Nicht-Erreichen von Akzeptanzkriterien gehören Störeffekte bei Immunoassays, die durch Kreuzreaktivitäten, Matrixeffekte, endogene Proteine und unspezifische Bindungen hervorgerufen werden. Oft werden diese Störungen erst durch ihren negativen Effekt auf die Präzision und Wiederfindung bei der Validierung bemerkt.

Puffersysteme gegen Störeffekte

Gerade für diese Probleme bei Immunoassays sind in den vergangenen Jahren Lösungen entwickelt worden, die effizient und wirksam die Ergebniszuverlässigkeit erhöhen (vgl. LABORWELT 6(4), S. 33-39). Es handelt sich um Puffersysteme aus Proben-Puffern und sogenannten Blockierern, wie zum Beispiel LowCross Buffer® und Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH, Münster). Den Kosten dieser Systeme stehen deutliche Ein-



Kits für die Verhinderung von Störeffekten bei Immunoassays

sparungen durch die Reduzierung von Entwicklungsschleifen und höherer Effizienz bei der Validierung gegenüber. Je früher in der Entwicklung derartige Systeme zum Einsatz kommen, desto größer ist in der Regel die Gesamteinsparung. Neben Revalidierungen können so auch Entwicklungszeiten in erheblichem Umfang reduziert werden und Kosten für die Entwicklung, Anpassung und GLP-konforme Herstellung eigener Puffer-Systeme entfallen.

Ein weiteres Werkzeug zur Kosten- und Zeitersparnis sind Vor-Validierungen im Rahmen der Entwicklung. Als vorteilhaft hat sich hierbei etwa eine vorgezogene Störuntersuchung durch Konfidenzanalyse erwiesen. Diese Betrachtung und Auswertung ist keine direkte Forderung der Richtlinie und dennoch hocheffizient. Bei der Auswahl von Dienstleistern zur Assay-Entwicklung sollte es daher auch ein Kriterium sein, ob Erfahrungen im Einsatz dieser Konfidenz-Betrachtungen und bei der frühzeitigen Erkennung sowie Vermeidung von Störeffekten vorhanden sind. Vorteil: Bevor die eigentliche Validierung gestartet wird, ist für den Entwickler meist schnell und einfach ablesbar, ob weitere Entwicklungsschleifen nötig sind. Auch der Vergleich gängiger mit den neuen Puffer-Systemen in Bezug auf die erzielbare Präzision und Wiederfindung lässt sich damit ermitteln, um die Entscheidung bezüglich der Materialauswahl auf eine klare Datenbasis zu stellen.

Zur Zeit- und Kostenminimierung bei der Validierung von ELISA-Tests sollten daher Entwicklungen und Entscheidungen auf Erfahrungen aufbauen. Fremd-Material in Bezug auf Verfügbarkeit und Chargen-Konsistenz ausgewählt und die Eigen-Produktion von Material auch in der Entwicklungsphase nur bei vollständiger Dokumentation und Überwachung auf Basis von SOPs zugelassen werden. Dazu kommen die stringente Prüfung aller Make-or-Buy-Entscheidungen unter Berücksichtigung interner Dokumentations- und Überwachungskosten sowie die frühzeitige Durchführung von Vor-Validierungen sowie die Verhinderung von Matrixeffekten. ■