

Kalibrierung von Kolbenhubpipetten im Rahmen der Akkreditierung nach DIN EN ISO 15189

Eine Stellungnahme

Daniela Huzly, Freiburg

Hintergrund

In der aktuellen Version der DIN EN ISO 15189 steht unter Punkt 5.3.1.4: „Das Laboratorium muss über ein dokumentiertes Verfahren zur Kalibrierungen der Ausrüstung verfügen, das sich direkt oder indirekt auf die Untersuchung auswirkt (1).“ Der Satz in der englischen Version ist leichter verständlich (in der deutschen Version liegt offensichtlich ein Übersetzungsfehler vor): „The laboratory shall have a documented procedure for the calibration of all equipment that directly or indirectly may affect examination results.“(2) Der Nebensatz bezieht sich auf den Ausrüstungsgegenstand (equipment) und nicht auf das Kalibrierungsverfahren. In Unterpunkt b) wird dabei gefordert: „Aufzeichnen der metrologischen Rückverfolgbarkeit des Kalibrierstandards und die rückführbare Kalibrierung des Ausrüstungsgegenstandes.“ Bei einem Erfahrungsaustausch der DAkks am 13. November 2013 (3) wurde dieser Punkt von Dr. Zimmermann erklärt:

Messtechnische (metrologische) Rückverfolgbarkeit bedeutet, dass eine ununterbrochene Kette von Messungen bis zum Nationalen Normal (=SI Einheit) nachvollziehbar ist. Bei jedem Schritt der Messung muss die jeweilige Messunsicherheit bekannt sein. Alle Messungen müssen dokumentiert sein und in einer *anerkannten Vorgehensweise* durchgeführt worden sein. Das Labor, das die Messungen durchführt, muss entsprechend kompetent sein und diese *Kompetenz nachgewiesen* haben, z.B. durch eine Begutachtung oder durch entsprechende Zertifikate. Die messtechnische Rückführung muss in regelmäßigen Abständen wiederholt werden; die Häufigkeit hängt von der Intensität der Nutzung des jeweiligen Gerätes ab, sollte aber mindestens einmal im Jahr betragen.

Für Kolbenhubpipetten wird diese Forderung so ausgelegt, dass die Kalibrierung in einem (von der DAkks) akkreditierten Labor (nachgewiesene Kompetenz) durchgeführt und die Durchführung in anerkannter Vorgehensweise durch ein DKD-Zertifikat bestätigt werden muss. Diese DKD-Kalibrierscheine müssen teuer bezahlt werden. Für welche Pipetten ist dies wirklich notwendig? Laut Norm betrifft es nur Geräte, durch die die Richtigkeit und Messgenauigkeit der Untersuchungsergebnisse (Zitat Dr. Zimmermann, Interpretation der Norm) beeinflusst werden kann.

Wir haben daher die verschiedenen Testsysteme in unserem virologischen Labor bezüglich Messungenauigkeit und Fehlereinfluss durch Ungenauigkeit beim Pipettieren beleuchtet. In kleinen Versuchsansätzen haben wir bis zu

10% des Pipettiervolumens verändert, um festzustellen, wie sich dies auf die Testergebnisse auswirkt.

Untersuchungsmethodik und Ergebnisse

1. Infektionsserologische Untersuchungen

1.a) Enzymteste

Enzymteste haben verfahrensbedingt hohe Messungenauigkeiten, Inter-Assay-Variationskoeffizienten von bis zu 15% oder sogar darüber sind eine Seltenheit. Dies ist durch das biologische System des Testverfahrens bedingt. Quantitative Verlaufsbeurteilungen (Änderungen von einer Probe zur anderen) sind nur im Parallelansatz im selben Testlauf möglich. Die dokumentierten Messungenauigkeiten betragen bei unseren Verfahren je nach Charge zwischen 1,5 und 17,8% bei Verwendung eines externen „Standards“.

Um festzustellen, ob Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang einen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis haben, haben wir bei zwei verschiedenen „quantitativen“ Enzymtesten (Masern-IgG, Varizellen-IgG) unterschiedliche Serummengen pipettieren lassen (9µl, 9,5µl, 10µl, 10,5µl und 11µl jeweils auf 1000µl Puffer). Parallel zu diesem Versuch wurden dieselben Seren in einer zweiten Platte von einer anderen MTA im normalen Testansatz mit 10µl angesetzt. Ergebnis: Bei Einsatz verschiedener Serummengen im selben Testansatz konnte man eine leichte Reduktion bzw. Erhöhung des Messwertes im Vgl. zu 10µl erkennen (siehe Beispiel in Tabelle 1).

Tabelle 1: Messung eines niedrig positiven Serums im VZV-IgG-ELISA

Ansatz MTA 1	Ergebnis
9 µl	111,1 IU/l
9,5 µl	118,1 IU/l
10µl-1	122,6 IU/l
10µl-2	124,5 IU/l
10µl 3	122,3 IU/l
10,5µl	129,8 IU/l
11 µl	136,4 IU/l
Ansatz MTA 2 am nächsten Tag	
10µl-1	103,8 IU/l
10µl 2	105,0 IU/l
10µl-3	103,2 IU/l

Die Ergebnisse des zweiten unabhängigen Testansatzes mit 10µl wichen jedoch deutlich stärker davon ab. Die niedrig positiven Ergebnisse waren trotzdem in allen Ansätzen positiv. Das heißt, dass selbst grobe Abweichungen von 10% des Nutzvolumens keinen signifikanten Einfluss auf die Richtigkeit und Genauigkeit des Messverfahrens haben.

1.b) Westernblot - /Lineblotverfahren

In kommerziellen Blotverfahren wird ebenfalls 1+100 verdünnt (meistens 20µl auf 20µl). Die Auswertung ist rein qualitativ, wobei eine cut-off-Bande für die Bewertung herangezogen wird.

Wir haben bei einem Verfahren, das eine sehr schwache Cut-off-Bande hat, bis zu 10% abweichendes Volumen pipettiert (18µl bis 22µl). Die Bandenintensität war bei 18µl minimal reduziert, die cut-off Bande war noch deutlich sichtbar. Eine Abweichung von 10% des Nutzvolumens hat also bei Blotverfahren keinen signifikanten Einfluss auf die Richtigkeit und Genauigkeit des Messverfahrens.

1.c) Immunfluoreszenz

In Immunfluoreszenzverfahren werden serielle Verdünnungsreihen angesetzt. Die Messungenauigkeit bei solchen semiquantitativen Verfahren liegt bei 1 bis 2 Titerstufen im Inter-Assay-Vergleich. Ein Mengenfehler bei der Pipette wird bei einer Verdünnungsreihe noch verstärkt, da bei jeder Verdünnungsstufe entsprechend weniger oder mehr pipettiert wird.

Wir haben eine Verdünnungsreihe von 1:8 bis 1:256 in einem Epstein-Barr-Virus VCA-IgG-Test angesetzt. Dabei wurde im normalen Ansatz mit einem 50µl Nutzvolumen gearbeitet, parallel dazu in einem zweiten Ansatz mit 45µl. Die Objektträger wurden von zwei unabhängigen Personen ausgewertet. Bei beiden Objektträgern kamen die Auswerter auf denselben Endtiter. Das heißt, auch bei Immunfluoreszenzverfahren haben Ungenauigkeiten von 10% keinen Einfluss auf die Richtigkeit und Genauigkeit des Testergebnisses.

2. Molekularbiologische Testverfahren

Die Messungenauigkeit molekularbiologischer Tests ist verfahrensbedingt hoch. Im Inter-Assay-Vergleich können Schwankungen bis zu 30% noch normal sein. Von klinisch relevanten Bewegungen kann erst ab etwa einer halben Logstufe Änderung ausgegangen werden.

Bei der PCR werden wenige µl aufgereinigte DNA/RNA zum PCR-Mix hinzugegeben. Wir wollten wissen, ob die Änderung der Menge der pipettierten Nukleinsäure einen Einfluss auf das quantitative Ergebnis der PCR hat. In einem Versuchsansatz wurden 4µl, 4,5µl, 5µl, 5,5µl und 6µl aufgereinigte DNA von zwei bekannten niedrig positiven Proben in einer quantitativen realtime PCR eingesetzt. Im gleichen Ansatz wurden je 3 mal 5µl eingesetzt. Die gleichen Proben wurden an einem zweiten Tag mit jeweils 5µl angesetzt. Zu unserer großen Überraschung änderte sich der Ct-Wert der PCR im Parallel-Ansatz mit den verschiedenen Mengen nur unwesentlich, während zwischen den Ansätzen unterschiedlicher Tage bis zu 2 Ct Unterschied waren. Die niedrig positiven Proben wurden auch in der falsch pipettierten Menge sicher positiv detektiert. Selbst bei quantitativen molekularbiologischen Verfahren scheinen demnach Pipettier-Ungenauigkeiten keinen signifikanten Einfluss auf die Richtigkeit und Messgenauigkeit der Testergebnisse zu haben (siehe Tabelle 2).

Diskussion

Die biologischen Testverfahren, die in einem virologischen oder mikrobiologischen Labor angewandt werden, haben also schon *per se* so hohe Messungenauigkeiten, dass kleine Schwankungen im Pipettiervorgang keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Wir haben dies schon immer vermutet und wurden durch die Ergebnisse unserer kleinen Versuchsreihen bestätigt. Um diese Ergebnisse ins Verhältnis zu setzen, ist es hilfreich die Kalbrierverfahren und Fehlergrenzen für Kolbenhubpipetten sowie zusätzliche Einflussfaktoren für die Messungenauigkeit von Pipetten zu beleuchten.

Für die Kalibration nach DKD-Standard (mit DKD-Kalibrierschein) müssen konkrete (rückgeführte!) Umgebungsbedingungen (Luftdruck, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Wassertemperatur etc.) sowie eine exakte Pipettier-technik (Winkel, Befeuchten, Eintauchtiefe) eingehalten werden (4,5). Zum gemessenen Fehlerwert einer Pipette (der den systematischen und zufälligen Fehler der Pipette wiedergibt) muss ein durchschnittliches Messunsicherheitsbudget von 0,12% hinzugerechnet werden, das den Einfluss von leichten Schwankungen bei den Umgebungsbedingungen ausgleichen soll. Der errechnete Wert muss dann innerhalb der Fehlergrenzen, die in der DIN 8655 definiert sind, liegen. Die erlaubten Fehlergrenzen liegen bei 1,4 bis 2,8% des Nennvolumens (6).

Tabelle 2: Einsatz verschiedener Pipettiervolumen in einer quantitativen real-time PCR

Pipettiervolumen	5µl	4µl	4,5µl	5µl	5,5µl	6µl	5µl
Ct-Wert Probe Nr. 619582	34,309	34,282	34,34	34,39	34,539	34,895	34,492
Ct-Wert 2. Tag Probe Nr. 619582	32,476						
Ct-Wert Probe Nr. 717712	32,826	32,147	32,605	32,295	32,224	31,015	32,164
Ct-Wert 2. Tag Probe Nr. 717712	33,464						

Die Kalibrierung mit DKD-Kalibrierschein bedeutet also nicht, dass eine Pipette engere Grenzen einhalten muss (und damit vermeintlich sicherer wäre). Es wird lediglich ein noch größerer Aufwand betrieben, um die Umgebungsbedingungen und den Kalibriervorgang zu standardisieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Pipette die Grenzen einhält, ist damit sogar noch größer. Beim Kalibriervorgang soll ja auch nur metrologisch überprüft werden, ob die Pipette tatsächlich das Volumen pipettiert, das angegeben ist. So wie wir bei einem Thermometer überprüfen, ob die angezeigte Temperatur der echten Temperatur entspricht. Für das Pipettieren konnte jedoch gezeigt werden, dass zusätzliche Faktoren wie das Handling und bestimmte Umgebungsbedingungen einen wesentlich größeren Einfluss auf die Messungenauigkeit haben als der systematische Fehler der Pipette (7,8). So sinkt z.B. das pipettierte Volumen bei jedem Grad Temperatur-Unterschied zwischen Pipette und Flüssigkeit um 0,3%. Wenn man also mit einer 22°C warmen Pipette eine 4°C kalte Flüssigkeit pipettiert, reduziert sich das Volumen um 5,4% (ein Umstand, der wahrscheinlich täglich im Labor passiert). Wird die Pipettenspitze nicht vorbefeuchtet, können bis zu 3% Volumenunterschied auftreten. Wird die Pipette beim Aufnehmen der Flüssigkeit schräg gehalten, reduziert sich die Menge um ca. 1% (9).

Was kann aus diesen Erkenntnissen abgeleitet werden?

Durch die Kalibrierung von Pipetten im DKD-Kalibrierverfahren wird nicht die Messgenauigkeit der Testverfahren erhöht (die Pipette selber wird dadurch ja nicht genauer) sondern lediglich mit höherer Genauigkeit das Pipettiervolumen der Pipetten bestimmt, so dass eine Abweichung von den erlaubten Fehlergrenzen sogar unwahrscheinlicher wird. Dies ist auf die standardisierten Bedingungen beim Kalibriervorgang zurückzuführen und spiegelt in keiner Weise den Laboralltag wider. Damit scheint das Verfahren keine sinnvolle Maßnahme zur Qualitätssicherung im Labor darzustellen. Es entspricht in etwa der Vorgehensweise von Autoherstellern bei der Messung der Verbrauchs- und Umweltwerte. Eine Überprüfung der Messgenauigkeiten unter realen Bedingungen hingegen findet in unseren Laboren schon tagtäglich statt, indem wir Kontrollen in unseren Testsystemen einsetzen, die innerhalb bestimmter Grenzen gemessen werden müssen. Es ist sinnvoll, die Ergebnisse der Kontrollen auf Kontrollkarten zu dokumentieren, um genau diese Überwachung durchzuführen. Nichts anderes machen unsere Laborautomaten, die ja auch pipettieren, und die wir schlecht in ein akkreditiertes Kalibrier-Labor schieben können, um die Genauigkeit des Pipettiervorgangs zu überprüfen.

Müssen wir dann unsere Pipetten überhaupt kalibrieren?

Im Prinzip sind die Kontrollkarten eine permanente Überwachung des Pipettiervorgangs im Ganzen. Da man jedoch Wartungen durchführen soll, um Fehler zu vermeiden, sollten Pipetten, die für Testansätze verwendet werden, zumindest einer einfachen Kalibrierung unterzogen werden. Bei dem nachweislich geringen Einfluss auf

das Testergebnis sollte eine jährliche Kalibrierung ausreichen. Wer die Möglichkeiten hat, kann die Kalibrierung im eigenen Labor durchführen. Da die Umgebungsbedingungen dort nicht so standardisiert und die Mitarbeiter nicht so routiniert sind wie in einem Kalibrierlabor besteht lediglich das Risiko, dass einige Pipetten, die eigentlich in Ordnung sind, die Fehlergrenzen überschreiten und eingeschickt werden müssen. Aus eigener Erfahrung können wir berichten, dass nahezu alle Pipetten, die in unserer Kalibrierstation durchgefallen sind, als vollkommen intakt vom Kalibrierservice zurückkommen.

Da das Handling einen deutlich größeren Einfluss auf die Messgenauigkeit hat, sollten die Mitarbeiter/innen regelmäßig an Pipettier-Schulungen teilnehmen. Solche Schulungen werden von verschiedenen Pipettenherstellern oder auch Kalibrierlaboren angeboten. Diese Maßnahme ist wahrscheinlich die, die die Messunsicherheit der Verfahren am ehesten beeinflussen kann.

Um die Gutachter zu überzeugen, muss eine Verfahrensanweisung zur Rückführungspolitik erstellt werden, aus der hervorgeht, wie kalibriert wird und warum bestimmte Verfahren gewählt oder nicht gewählt wurden. Man muss also nur gut begründen können, warum man tut, was man tut. Dieser Beitrag soll Ihnen dabei eine Hilfestellung sein.

Quellen:

- [1] DIN EN ISO 15189:2012. Medizinische Laboratorien – Anforderungen an die Qualität und Kompetenz. Deutsche Fassung
- [2] DIN EN ISO 15189:2012. Medizinische Laboratorien – Anforderungen an die Qualität und Kompetenz. Englische Fassung
- [3] Erfahrungsaustausch akkreditierter Laboratorien, 27.11.2014, Frankfurt a. M.
- [4] Richtlinie DKD-R-8.1 Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster. 12/2011
- [5] PTB: Expertenbericht DKD-E-8.1 Experimentelle Studie zur Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster. 09/2013
- [6] DIN EN ISO 8655-6: 2012-12. Volumenmessgeräte mit Hubkolben. Teil 6. Gravimetrische Prüfverfahren zur Bestimmung der Messabweichung.
- [7] PTB: Expertenbericht DKD-E-8.2 Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster 05/2013
- [8] PTB: Expertenbericht DKD-E-8.3 Einfluss der Höhenlage auf das Volumenergebnis einer Kolben-Hubpipette mit Luftpolster 09/2013
- [9] Swiss Calibration Service: Fehlereinflüsse beim Pipettieren. www.spaelti-ts.ch

Korrespondenzadresse

Dr. med. Daniela Huzly
Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene
Abteilung Virologie
Hermann-Herder-Str. 11
79104 Freiburg
Telefon 0761 - 20366-09
Telefax 0761 - 20366-08
E-Mail daniela.huzly@uniklinik-freiburg.de