BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

ELISA

Duplikate, Triplikate oder Einzelmessungen im ELISA

Unser Partner Enzo Life Sciences ist ein biowissenschaftliches und biotechnologisches Unternehmen, das sich auf die Nutzung biologischer Prozesse zur Entwicklung von Forschungsinstrumenten, Diagnostika und Therapeutika konzentriert und als Anbieter von Testdienstleistungen, einschließlich exotischer Tests, für die medizinische Gemeinschaft fungiert.

Dr. Hartmut Pohl, Senior Application Scientist bei Enzo, verfügt über umfassendes Fachwissen in Bezug auf experimentelle Einstellungen und gibt detaillierte Ratschläge, wie oft eine ELISA-Messung wiederholt werden sollte.

Verschiedene Arten von Replikaten

Die experimentelle Wissenschaft stützt sich auf wiederholte Messungen und deren statistische Auswertung. Aber wie und wie häufig sollten Experimente wiederholt werden? Der erste Schritt zur Beantwortung dieser Frage besteht darin, den Unterschied zwischen biologischen und technischen Replikaten zu verstehen.

Bei **biologischen Replikaten** handelt es sich um unterschiedliche biologische Proben, z. B. Blutproben von verschiedenen Einzelpatienten.

Technische Replikate hingegen sind Wiederholungen des experimentellen Verfahrens, d. h. die mehrfache Durchführung desselben Tests mit derselben biologischen Probe.

Biologische Replikate bilden die Grundlage einer soliden statistischen Analyse zur Kontrolle der natürlichen Variabilität. Technische Wiederholungen dienen der Bestimmung und Kontrolle der Variabilität der Methode selbst. Ob sie hilfreich oder notwendig sind, hängt sowohl von der Methode als auch vom Studiendesign sowie von der Verfügbarkeit biologischer Proben und

allgemeiner Ressourcen ab. In einigen Szenarien kann es vorteilhaft sein, die Variabilität der Methode genau zu kontrollieren, während es in anderen Fällen besser ist, eine ausreichend große Anzahl biologischer Proben nur einmal zu messen und die technische Variabilität als Teil der Gesamtdatenfluktuation zu berücksichtigen. Idealerweise wird im Rahmen der Versuchsplanung eine detaillierte statistische Leistungsanalyse durchgeführt, um festzustellen, wie viele und welche Art von Wiederholungen erforderlich sind.

Replikate im ELISA

Dieser Grundsatz gilt natürlich auch für enzymatische Immunassays (ELISAs). ELISA ist eine weit verbreitete Labortechnik, die je nach spezifischer Anwendung und Verwendungszweck von technischen Wiederholungen profitieren kann oder nicht. Die Notwendigkeit und der Wert technischer Wiederholungen können je nach Diagnose- und Forschungsanwendung und dem Gesamtumfang der Analyse sehr unterschiedlich sein. Es versteht sich von selbst, dass die Reduzierung von Replikaten erhebliche Kosteneinsparungen mit sich bringen kann - die jedoch schnell wieder aufgezehrt werden, wenn Messungen wiederholt werden müssen. Ob technische Replikate verwendet werden oder nicht, d. h. ob einzelne Wells, Duplikate oder Triplikate für eine bestimmte Probe gemessen werden, hängt letztlich von den Präferenzen der Endbenutzer, der Frage, die der Test beantworten soll, und schließlich von der individuellen Entscheidung ab, die Effizienz mit der Datengenauigkeit in Einklang zu bringen.

Werfen wir einen Blick auf die Vor- und Nachteile von Einzelmessungen, Duplikaten und Triplikaten, um zu entscheiden, welche Methode für einen bestimmten Test vorzuziehen ist:

Einzelmessungen

Einzelmessungen mit einem Well pro Probe ermöglichen es, die Ressourcen zu maximieren und so viele Proben wie möglich mit einem bestimmten Assay zu messen. Einzelmessungen werden im Allgemeinen verwendet, wenn ein hoher Durchsatz wichtiger ist als die Datenvariabilität, und sie sind besonders nützlich, wenn das Ziel eine halbquantitative oder qualitative Analyse ist. Insbesondere qualitative ELISA-Assays, die ein positives oder negatives Testergebnis liefern, aber nicht für jede Probe einen Wert angeben, werden häufig in Verbindung mit Single-Well-Messungen verwendet. Diese Arten von Analysen beruhen oft auf einer soliden Grundlage von erwarteten Wertbereichen für eine typische Probe und sind auf Wiederholungsprüfungen angewiesen, um Ausreißer zu analysieren.

Darüber hinaus können Einzelmessungen für Studiendesigns mit wiederkehrenden Messungen von Proben aus einer einzelnen biologischen Quelle ausreichen, z. B. bei Zeitverlaufsexperimenten, bei denen in bestimmten Abständen Proben von einer bestimmten Probe entnommen und gemessen werden. In diesen Fällen können Ausreißer im Vergleich zu den anderen Proben desselben Ursprungs identifiziert werden.

Schließlich können Einzelmessungen bei Anwendungen mit hohem Durchsatz ausreichen, bei denen das Testen einer großen Anzahl von Proben wichtiger ist als die Gewissheit über die einzelne Probe. Außerdem können die Abweichungen zwischen den Proben in Bezug auf den gemessenen Wert sehr hoch sein. Dies ist regelmäßig der Fall bei ELISA-Anwendungen in der Qualitätskontrolle der biologischen Produktion.

Fehleranalyse und -korrektur: Bei Einzelmessungen ist es unmöglich, Ausreißer und fehlerhafte Datenpunkte zu erkennen. Fehlerhafte Messungen können daher nicht eindeutig identifiziert oder korrigiert werden und bleiben unbemerkt.

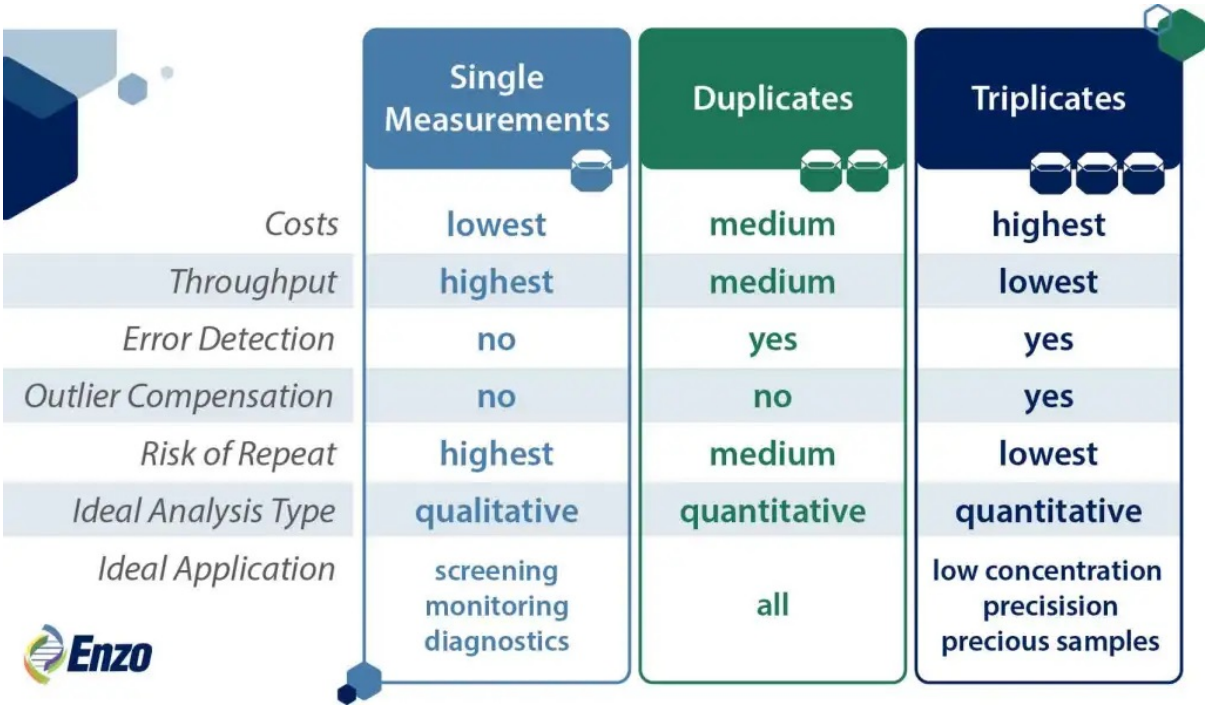
Es ist daher von entscheidender Bedeutung, sich darüber im Klaren zu sein, dass der erhaltene Datensatz eine gewisse Fehlerspanne enthält. Bei qualitativen ELISA-Tests besteht die Kompensationsstrategie häufig darin, eine großzügige Fehlerspanne in die Analyse einzubauen und Cutoff-Werte für die Bestimmung negativer und positiver Proben festzulegen, die deutlich unter oder über dem tatsächlichen Cutoff-Wert liegen, und jedes Ergebnis als „unsicher“, „erneuter Test“ oder ähnlich zu kennzeichnen, wenn die Werte innerhalb der festgelegten Fehlerspanne des tatsächlichen Cutoff-Werts liegen. Diese Tests beruhen in der Regel auf klaren Erwartungen in Bezug auf die Wertebereiche, in die die getesteten Proben fallen sollten. Bei zertifizierten diagnostischen Tests wurden diese Werte durch klinische Studien ermittelt, die die Grundlage für die Zertifizierung bilden.

Wenn es sich um einen quantitativen Test handelt, sollte die Single-Well-Analyse nur dann verwendet werden, wenn das Ziel darin besteht, die Mittelwerte von Gruppen von Proben zu analysieren und die Kohorten groß genug sind, dass individuelle Verfahrensfehler die nachfolgende Analyse nicht beeinträchtigen. Quantitative Single-Well-Messungen werden für die Quantifizierung von Einzelproben nicht empfohlen.

Hinweis: Einzelmessungen haben durchaus ihre Berechtigung und können sehr nützlich sein, wenn sie mit der beabsichtigten Analyse übereinstimmen. Es ist jedoch generell ratsam, die wesentlichen Kontrollen und Standards in Doppelbestimmungen durchzuführen. Während die Analyse von Proben mit Einzelmessungen zur Folge hat, dass einzelne Verfahrensfehler unbemerkt bleiben und somit einzelne Proben fehlerhaft sein können, führen unbemerkte Abweichungen oder Fehler in den Kontrollen oder Standards zu einem Gesamtfehler in allen erhaltenen Daten und einer

Fehlinterpretation aller Ergebnisse. Daher sollte die Messung von Standards und wichtigen Kontrollen in einzelnen Wells vermieden werden.

Es ist generell nicht ratsam, Messungen in einzelnen Wells pro Probe vorzunehmen, es sei denn, die Folgen potenziell unentdeckter Messfehler wurden gut bedacht und werden durch die Versuchsplanung, den Versuchsplan und/oder die Ergebnisanalyse kompensiert.



	Single Measurements	Duplicates	Triplicates
Costs	lowest	medium	highest
Throughput	highest	medium	lowest
Error Detection	no	yes	yes
Outlier Compensation	no	no	yes
Risk of Repeat	highest	medium	lowest
Ideal Analysis Type	qualitative	quantitative	quantitative
Ideal Application	screening monitoring diagnostics	all	low concentration precisision precious samples

Tabelle: Vor- und Nachteile der Anzahl der Wiederholungen pro Probe bei der ELISA-Analyse.

Doppelmessungen

Doppelmessungen sind im Allgemeinen der Sweet Spot für ELISA-Analysen und ein idealer Kompromiss zwischen Fehlermanagement und hoher Durchsatzkapazität. Doppelmessungen ermöglichen ein gewisses Maß an Fehlerkompensation, indem ein Mittelwert aus zwei Messungen berechnet wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass die Messung näher am tatsächlichen Wert liegt. Enzo empfiehlt Doppelmessungen für die überwiegende Mehrheit unserer ELISA-Kits.

Fehleranalyse und -korrektur: Die Messung jeder Probe in zwei einzeln pipettierten Wells ermöglicht die Identifizierung von Fehlern und Ausreißern, nicht aber deren Kompensation. Messabweichungen können z. B. durch die Berechnung von Variabilitäten als %CV oder Standardabweichung ermittelt werden. Es kann ein Schwellenkriterium festgelegt werden, bei dem die Variabilität zwischen zwei Messungen als zu hoch für eine Verwendung angesehen wird.

Üblicherweise werden %CV von mehr als 15-20 % verwendet, aber die Wahl des Schwellenwerts kann sich je nach individueller Präferenz und experimentellen oder analytischen Anforderungen ändern. Proben, die den festgelegten Schwellenwert überschreiten, sollten für die Analyse außer Acht gelassen und nach Möglichkeit erneut gemessen werden. Es wird nicht empfohlen, einzelne Messungen in einem Duplikatpaar zu verwerfen und die Analyse mit dem verbleibenden Einzelmesswert durchzuführen. Auch wenn es manchmal offensichtlich zu sein scheint, welcher Brunnen der problematische ist, gibt es keine systematische Methode, um die fehlerhafte Messung unter zwei Duplikaten mit Sicherheit zu identifizieren. Es mag Ausnahmen geben, z. B. wenn man sich daran erinnert, dass man vergessen hat, eine Komponente in genau dieses Well zu pipettieren, aber im Allgemeinen sollte die Analyse entweder auf der Grundlage beider Duplikate durchgeführt werden, oder die gesamte Probe sollte von der Analyse ausgeschlossen (und nach Möglichkeit wiederholt) werden.

Dreifachmessungen

Dreifachmessungen ermöglichen eine wesentlich bessere Kontrolle und Kompensation von Fehlern. Der aus dreifachen Messungen errechnete Mittelwert entspricht mit wesentlich höherer Wahrscheinlichkeit dem wahren Wert der Analytkonzentration einer Probe. Daher ist die Verwendung von Dreifachmessungen angezeigt, wenn die Präzision der Daten von größter Bedeutung ist. Allerdings geht dies mit einer erheblichen Verringerung der Durchsatzkapazität und der Effizienz des Reagenzieneinsatzes einher.

Fehleranalyse und -korrektur: Dreifachmessungen ermöglichen nicht nur die Identifizierung fehlerhafter Messungen, sondern auch deren Korrektur. Durch die Identifizierung von Ausreißern können einzelne Messungen ausgeschlossen werden, und die Probe kann auf der Grundlage der verbleibenden zwei von drei Triplikaten quantifiziert werden. Die Identifizierung und der Ausschluss von Ausreißern sollten jedoch auf der Grundlage harter, vordefinierter Kriterien erfolgen. Proben mit hoher Variabilität sollten identifiziert werden, z. B. anhand von %CV, Standardabweichung, Vielfachen von Sigma oder anderen Methoden. Ausreißer innerhalb dieser Proben sollten anhand der Abweichung vom Mittelwert der drei Wiederholungen ermittelt werden. Ausreißer oberhalb eines vordefinierten Schwellenwerts können außer Acht gelassen werden, und der Wert kann auf der Grundlage von zwei der drei Wiederholungen berechnet werden. Kann kein Ausreißer ermittelt werden oder ist die Gesamtstreuung zwischen allen drei technischen Wiederholungen zu groß, kann die gesamte Probe außer Acht gelassen und nach Möglichkeit neu gemessen werden.

Zusammenfassung

- Die Wahl der richtigen Anzahl technischer Wiederholungen bei ELISA ist der Schlüssel zum Ausgleich zwischen Ressourceneffizienz und Datenqualität.
- Einzelmessungen sind effizient für ELISAs mit hohem Durchsatz oder qualitativem Charakter, ermöglichen aber keine Fehlererkennung und sind daher für eine präzise Quantifizierung ungeeignet.
- Duplikate bieten ein gutes Gleichgewicht zwischen Genauigkeit und Effizienz, da sie zwar eine Fehlererkennung, aber keine Korrektur ermöglichen - bei zu großer Variabilität ist eine erneute Prüfung erforderlich.
- Triplikate bieten die höchste Genauigkeit und ermöglichen die Entfernung und Korrektur von Ausreißern, verringern jedoch den Durchsatz und verbrauchen mehr Ressourcen.
- Die Wahl hängt von den Zielen, den akzeptablen Fehlerniveaus und der Verfügbarkeit von Ressourcen ab.

Quelle: Enzo Technologies, Tech. Note "When to use Triplicates, Duplicates, or Single Measurements in ELISA – And Why"