

Correction of measurement errors in ELISA test

Suli J, Benisek Z, Svrcek S, Ondrejková A, Ondrejka R

Korekcia chýb merania v teste ELISA

Abstract

Suli J, Benisek Z, Svrcek S, Ondrejková A, Ondrejka R:
Correction of measurement errors in ELISA test
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (10): 565—568

The authors followed the influence of the arrangement of measured and control samples on microtitration plate on the ELISA test results by quantitative evaluation of rabies antibodies titres in human blood serum. They performed the test under identical conditions in all microtitration plate wells. They calculated the result according to five calibration curves – four of them were obtained by different positioning of the control positive and negative sera and the fifth curve was obtained from average values. The results from the four various positional calibration curves were significantly statistically different from the average. However, the average calibration curve – obtained from four measurements – led to identical value of rabies antibodies in cases with different dilutions of sera. The authors propose to follow some principles of measured and control samples arrangement on microtitration plates in order to minimize the errors, caused by their dishomogeneity. (Tab. 2, Fig. 3, Ref. 10.)

Key words: correction of measurement errors, ELISA test, rabies antibodies titre, human blood serum.

Z viacerých variantov metód enzýmovej imunoanalýzy (EIA) (Collins, 1985; Myai, 1985; Pal, 1986) sa v súčasnosti najviac používa metóda ELISA (Engwall, 1977; Woller, 1978) — enzyme linked immunosorbent assay, pri ktorej sa jedna z reagensí viaže na pevnú fázu (mikrotitračná platňa z polystyrénu) a voľné a viazané značené reagensie sa navzájom oddelia premytím. Metóda ELISA je relatívne rýchla — výsledky sa získavajú v priebehu 6—8 hodín, a spĺňa vysoké nároky na testy pre rýchlu a citlivú diagnostiku aj pri vykonaní veľkého počtu vyšetrení. Preto sa v lekárskej praxi často používa, napr. na stanovenie titru protilátok proti rôznym antigénom.

V praxi sa však ukázalo, že niektoré riadky alebo stĺpce na mikrotitračných platniach (MiP) môžu poskytovať rozdielne vý-

Abstrakt

Süli J., Beníšek Z., Švrček Š., Ondřejková A., Ondrejka R.:
Korekcia chýb merania v teste ELISA
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 10, s. 565—568

Autori sledovali vplyv rozmiestnenia meraných a kontrolných vzoriek na mikrotitračnej platni na výsledky testu ELISA kvantitatívnym hodnotením titra antirabických protilátok v ľudskom krvnom sére. V každej jamke mikrotitračnej platne robili stanovenie za rovnakých podmienok. Výsledok vypočítali podľa piatich kalibračných závislostí — štyri boli získané rôznym umiestnením kontrolných pozitívnych a negatívnych sér na mikrotitračnej platni a piata z priemerných hodnôt. Výsledky získané zo štyroch pozične rozdielnych kalibračných kriviek sa významne líšili od výsledku z priemernej kalibračnej krivky. Priemerná kalibračná krivka — získaná zo štyroch rôznych meraní — však viedla k identickej hodnote titru antirabických protilátok nameraných pri rôznych pracovných riedeniach séra. Autori navrhujú pre minimalizovanie chýb vyplývajúcich z nehomogenosti mikrotitračných platní dodržiavať určité zásady pri rozmiestňovaní kontrolných aj meraných vzoriek na nich. (Tab. 2. obr. 3, lit. 10.)

Kľúčové slová: korekcia chýb merania, test ELISA, antirabické protilátky, ľudské krvné sérum.

sledky aj pri úplne rovnakých podmienkach práce. Testovaním homogenosti MiP (Süli a spol., 2000) sme zistili, že na väčšine MiP (bez ohľadu na výrobcu) sa vyskytujú „pozitívne a negatívne zóny“, teda miesta, kde budú namerané hodnoty absorbancie s veľkou pravdepodobnosťou vyššie (pozitívna zóna) alebo nižšie (negatívna zóna) ako priemerná hodnota absorbancie z celej platne. Zaujímalo nás, ako sa to prejaví pri prepočte na titer antirabických protilátok na základe nelineárnej kalibračnej krivky. Ďalšou otázkou je, ako bude ovplyvnený titer protilátok umiestnením kontrolných vzoriek. Nesprávne rozmiestnenie vzoriek na MiP totiž môže viesť k falošným výsledkom. Obzvlášť problematické je to v prípade, keď je titer protilátok na hranici, od ktorej sa pacient považuje za dostatočne chráneného (podľa WHO je to v prípade titra

Department of Infectology and Tropical Animal Medicine, University of Animal Medicine, Kosice janos@dodo.sk

Address for correspondence: J. Suli, University of Medicine, Komenského 73, SK-041 81 Kosice, Slovakia.
Phone: +421.95.6332 111, Fax: +421.95.6323 666

Katedra infektológie a tropickej veterinárnej medicíny Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

Adresa: J. Süli, Katedra infektológie a tropickej veterinárnej medicíny UVL, Komenského 73, 041 81 Košice.

		RIEDENIE KONTROL												
		32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	
KONTROLNÉ VZORKY	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	⊕	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	⊕	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Fig. 1. Distribution of control positive (titer = 20.7 UE/ml) and control negative samples for the formation of calibration curves A-B, C-D, E-F, G-H, and average calibration curve.

Obr. 1. Rozmiestnenie kontrolnej pozitívnej (titer = 20,7 UE/ml) a kontrolnej negatívnej vzorky pre zostrojenie kalibračných kriviek A-B; C-D; E-F; G-H a priemernej kalibračnej krivky.

antirabických protilátok hodnota 0,5 UE/ml). V takom prípade aj na základe malého rozdielu možno výsledok nesprávne zaradiť, čo by mohlo viesť k nedostatočnej vakcinácii, resp. k prípadným zbytočným revakcináciám.

Materiál a metódy

Na určenie zákonitostí chýb pri použití MiP sme analyzovali merania z 51 MiP rôznej proveniencie. Vo všetkých jamkách jednotlivých platní sme určovali antirabické protilátky v krvnom sére imunizovaných ľudí (Beníšek a spol., 1989; Süliová a spol., 1994) za rovnakých podmienok. Podrobnejšie údaje sú uvedené v práci Süli a spol. (2001).

Tab. 1. "Positive" and "negative" zones on the basis of 51 MiP analysis. Tab. 1. „Pozitívne“ a „negatívne“ zóny na základe analýzy 51 MiP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+
C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0	+
D	+	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E	+	+	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+
F	+	-	0	-	-	-	-	-	-	-	+	+
G	+	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	+

Legend:

+ – measured values are mostly higher than the average

- – measured values are mostly lower than the average

0 – measured values equal the average, i.e. 50-50 % higher or lower

+ – namerané hodnoty sú väčšinou vyššie ako priemer

- – namerané hodnoty sú väčšinou nižšie ako priemer

0 – namerané hodnoty sú vyrovnané okolo priemeru, t.j. 50-50% vyššie a nižšie

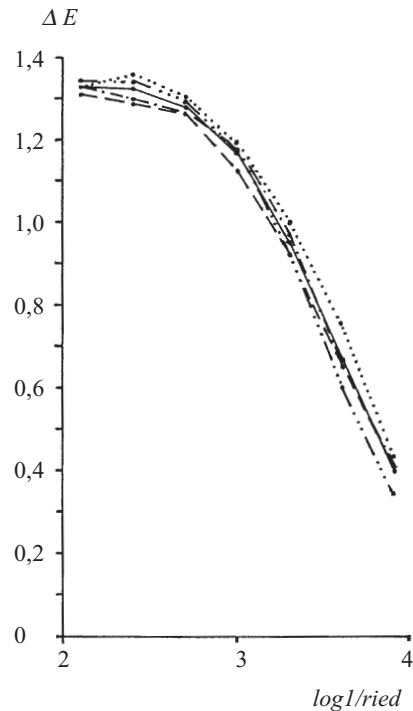


Fig. 2. Calibration curve A-B, C-D, E-F, G-H and plate I average curve. The sample dilution is 1:64. A-B -...-, C-D - - -, F-F -.-., G.H, average —.

Obr. 2. Kalibračné krivky A-B; C-D; E-F; G-H a priemerná pre platňu I. Riedenie vzorky 1:64. A-B -...-, C-D - - -, F-F -.-., G.H, priemerná —.

Na testovanie vplyvu pozície vyšetrovanej a kontrolnej vzorky na MiP sme zvolili ten istý ELISA test na stanovenie antirabických protilátok. Sledovanú vzorku sme vyšetřili v každej jamke MiP (Gama, závod 4, Trhové Sviny, ČR) za rovnakých podmienok. Ďalšiu platňu sme použili na kontrolné vzorky — teda na zostrojenie kalibračnej závislosti k výpočtu titra antirabických protilátok. Pozitívnu a negatívnu kontrolnú vzorku sme rozmiestnili v pároch: riadky A(+)-B(-); C(+)-D(-); E(+)-F(-); G(+)-H(-) (obr. 1). Na základe nameranej hodnoty v každej jamke zvlášť sme vypočítali titer antirabických protilátok podľa kalibračnej krivky A-B, C-D, E-F, G-H a tiež kalibračnej krivky zostrojenej z priemerných hodnôt zo všetkých štyroch párov (tzv. priemerná kalibračná krivka). Vypočítané hodnoty titra pre každú kalibračnú závislosť zvlášť sme spriemerňovali a navzájom porovnali.

Týmto postupom sme vyšetřili vzorku pri dvoch riedeniach (1:64; 1:256). Parametre charakteristické pre MiP sme vypočítali podľa vzorcov uvedených v práci Süli a spol. (2001). Titer antirabických protilátok sme vypočítali spôsobom odporučeným WHO (1992). Štatistickú významnosť rozdielov medzi jednotlivými výsledkami vypočítanými podľa rôznych kalibračných kriviek sme hodnotili Studentovým t-testom, pričom základom porovnania bol titer vypočítaný na základe priemernej kalibračnej závislosti.

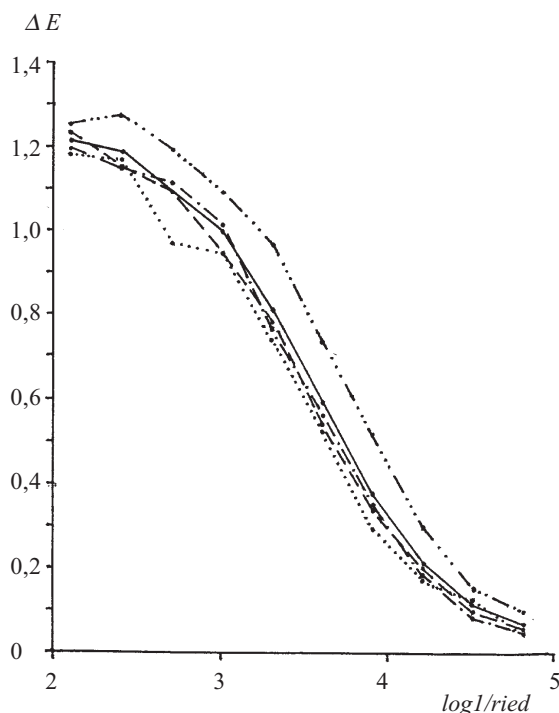


Fig. 3. Calibration curves A-B, C-D, E-F, G-H and plate II average curve. The sample dilution is 1:256. A-B ----, C-D ---, F-F --, G.H, average —.
Obr. 3. Kalibračné krivky A-B; C-D; E-F; G-H a priemerná pre platňu II. Riedenie vzorky 1:256. A-B ----, C-D ---, F-F --, G.H, priemerná —.

Výsledky

Na základe analýzy meraní z 51 mikrotitračných platní rôzneho proveniencie sme zistili, že na MiP sa nachádzajú „pozitívne“ a „negatívne“ zóny (tab. 1). Podrobnejšie údaje uvádzame v práci Süli a spol. (2001).

Pri oboch riedeniach vzorky sme namerali také hodnoty absorbancie pri 492 nm, ktoré boli v súlade s požadovanými kritériami pre MiP (Mančál, 1987). Variačný koeficient CV, ktorý vyjadruje chybu merania, bol 2 %, resp. 6 %, tzn. nepresahoval dovolenú hranicu 10 % (tab. 2). Bolo splnené aj kritérium, že v intervale $x \pm 1$ SD sa má nachádzať aspoň 67 % nameraných hodnôt; $x \pm 2$ SD aspoň 95 % a $x \pm 3$ SD aspoň 99 % hodnôt.

Odchýlky od priemernej hodnoty absorbancie boli najmarkantnejšie v riadku A a v stĺpci 12, čiastočne v stĺpci 1, no iba vo výnimočných prípadoch presahovala odchýlka 10 % (priemerne 1,5, resp. 4,6 %).

Zaujímavé výsledky priniesli výpočty hladiny antirabických protilátok podľa jednotlivých kalibračných kriviek. Kalibračné krivky A-B, C-D, E-F, G-H a tiež tzv. priemerná (zostrojená z priemerných hodnôt) pre obe vyšetrenia sú znázornené na obrázkoch 2 a 3. Riedenie vzorky treba zvoliť tak, aby rozdiel $\Delta E = E_{\text{vzorka}} - E_{\text{neg.kontrola}}$ zapadol do najvyrovnanejšej lineárnej oblasti. Z obrázka 3 je zjavné, že náhodné nepravidelnosti na kalibračnej krivke (krivka G-H a celkovo vyššie hodnoty

Tab. 2. The results of examined levels of anti-rabies antibodies in two sample dilutions (each dilution on a separate plate, plate I dilution is 1:64, plate II dilution is 1:256).

Tab. 2. Výsledky vyšetrenia hladiny antirabických protilátok pri dvoch riedeniach vzorky (každé na samostatnej platni, I — riedenie 1:64; II — riedenie 1:256).

Plate No	E_{492}	Calibration curve	Titre (UE/ml)	$CV_T(\%)$	DeltaT(%)
Platňa č.	E_{492}	Kalibračná krivka	Titer (UE/ml)	$CV_T(\%)$	deltaT(%)
I.					
		average priemerná	1,389+0,215	15,5	11,9
	1,361+0,027	A-B	1,443+0,218	15,1	11,9
	$CV_E=2\%$	C-D	1,776+0,276 ^{xx}	15,6	11,7
		E-F	1,300+0,217 ^x	16,7	11,8
		G-H	1,168+0,139 ^{xx}	11,3	8,6
II.					
		average priemerná	1,406+0,235	16,7	13,4
	0,846+0,051	A-B	0,853+0,126 ^{xx}	14,8	11,6
	$CV_E=6\%$	C-D	1,569+0,297 ^{xx}	18,9	15,4
		E-F	1,590+0,217 ^{xx}	13,6	10,6
		G-H	1,823+0,294 ^{xx}	16,1	12,7

E_{492} – average value of absorbance measured at 492 nm from the whole plate,

CV_E – plate variation coefficient for the measured values of absorbance, CV_T – plate variation coefficient for the calculated titres of anti-rabies antibodies,

UE – equivalents of international units (unit equivalents),

DeltaT – average deviation from the mean value of plate titer expressed in %

^x – $p < 0.01$, ^{xx} – $p < 0.005$

E_{492} – priemerná nameraná hodnota absorbancie pri 492 nm z celej platne;

CV_E – variačný koeficient platne pre namerané hodnoty absorbancie;

CV_T – variačný koeficient platne pre vypočítané titre antirabických protilátok;

UE – ekvivalenty medzinárodných jednotiek (unit equivalents);

deltaT – priemerná odchýlka od strednej hodnoty titru na platni v percentách.

^x – $p < 0.01$; ^{xx} – $p < 0.005$

krivky A-B) možno vylúčiť práve spriemerňovaním nameraných hodnôt z rôzne umiestnených kalibračných závislostí. V tabuľke 2 vidieť, že hodnota titra získaná z priemernej kalibračnej krivky je pri oboch riedeniach prakticky rovnaká aj napriek viditeľným rozdielom medzi hodnotami získanými z rôzne umiestnených kalibračných kriviek. Pri prepočte na titer však malé zmeny v nameraných hodnotách absorbancie sa zväčšia, a to viedlo k tomu, že variačný koeficient CV pre titer antirabických protilátok (CV_T) prekročil 10 %. Medzi hodnotami titrov sú dokonca štatisticky významné rozdiely v závislosti od pozície kontrolných vzoriek.

Záver

„Nespoľahlivosť“ krajných riadkov na mikrotitračných platniach je dobre známa každému, kto s nimi pracuje. Naše predchádzajúce zistenia (Süli a spol., 2001) to potvrdili a aj tieto vyšetrenia tomu nasvedčujú. Štatisticky významné rozdiely vo vý-

sledkoch získaných jedným vyšetrením, iba s rôznym umiestnením kontrolných vzoriek nás vedú k názoru, že je vhodná opatnosť pri hodnotení výsledkov získaných metódou ELISA. Pretože rozdiely nemajú pravidelný charakter, resp. počet vyšetrení nebol dostatočný na posúdenie určitých zákonitostí, na vylúčenie vplyvu pozície vyšetrovanej a kontrolnej vzorky na MiP navrhujeme dodržať pri kvantitatívnych testoch ELISA niektoré zásady:

1. podľa možnosti nepoužívať k práci „krajné“ riadky a stĺpce (A, H, 12,1);
2. kontrolné vzorky neumiestniť do krajných riadkov, alebo stĺpcov;
3. podľa možnosti urobiť viac kalibračných závislostí a ich hodnoty spriemerňovať;
4. duplikáty vzoriek neumiestniť vedľa seba, ale podľa možnosti raz do „pozitívnej“ raz do „negatívnej zóny“, vypočítané titry spriemerňovať;
5. vzorky vyšetřovať pri viacerých riedeniach, vypočítané titry spriemerňovať;
6. v prípade neistoty opakovať vyšetrenie.

Literatúra

Beníšek Z., Süliová J., Švrček Š., Závadová J.: ELISA test pre titráciu antirabických protilátok. Veterin. Správy, 3, 1989, č. 1–2, s. 25–27.

Collins W.P. (Ed.): Alternative Immunoassays. Chichester, John Wiley et Sons 1985.

Engwall E.: Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). In: Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins. Vol. 2. New York, Plenum Press USA 1977.

Mančal P.: Metody enzymové imunoanalýzy. Praha, ÚSOL 1987.

Myai K.: Advances in Nonisotopic Immunoassay. In: Advances in Clinical Chemistry. Vol. 24. Acad. Press Orlando, USA, 1985.

Pal S.B. (Ed.): Immunoassay Technology. Vol. 2. de Gruytech, Berlin, Nemecko, 1986.

Süliová J., Beníšek Z., Švrček Š., Ďurove A., Závadová J.: Kvantifikácia hladiny antirabických protilátok v sére vakcínovaných ľudí. Bratisl. lek. Listy, 95, 1994, s. 73–77.

Süli J., Beníšek Z., Švrček Š., Ondřejková A., Ondřejka R.: Nehomogenosť mikrotitračných platní a jej vplyv na výsledky ELISA testu. Klin. biochem. metab., 2001, v tlači.

WHO Expert Committee on Rabies. Techn. Report Series. 8th Report, No. 824. Geneva, WHO 1992.

Woller A., Bartlett A., Bidwell D.E.: Enzyme Immunoassay with special reference to ELISA techniques use. J. Clin. Pathol., 31, 1978, s. 507–512.

Received August 22, 2000.

Accepted October 20, 2000.