

## ELISA-Validierung

# Gute Planung spart viel!

TOBIAS POLIFKE UND PETER RAUCH  
CANDOR BIOSCIENCE GMBH, MÜNSTER

**ELISA werden als bioanalytische Verfahren in der Pharmaforschung und vielen anderen Bereichen der Life Sciences eingesetzt. Nach erfolgreicher Entwicklung und Optimierung ist die adäquate Validierung des Assays entscheidend, um den Assay praxistauglich zu machen. Hier stellt der Anwender die Vertrauensfrage an den Assay um die Zuverlässigkeit von Ergebnissen beurteilen zu können.**

■ Doch gerade bei dieser wesentlichen Frage findet man mitunter Unsicherheit über den notwendigen Umfang bei Anwendern und Entwicklern. Um eine sinnvolle Validierung durchführen zu können, muss man immer genau die spätere Verwendung, also den „Intended Use“ des ELISA betrachten und darf dabei auch den Kostenaspekt nicht aus dem Auge verlieren. Kleinere Vor-Validierungen mit Realproben im Rahmen der Entwicklung können Kosten sparen und die Sicherheit erhöhen.

Ein Assay wird immer für eine bestimmte Fragestellung entwickelt und auch validiert. Diese Fragestellung ist als „Intended Use“ der Dreh- und Angelpunkt aller Entscheidungen zum notwendigen Umfang der Validierung. Die Validierung dient dazu, Fragen zu klären wie z. B.: In welchem Messbereich kann der ELISA die Substanz quantifizieren? Ab welcher Mindestkonzentration kann der ELISA die Substanz überhaupt nachweisen? Entspricht ein gemessener Wert dem richtigen Wert und wie hoch sind in der Regel die Abweichungen? Gibt es Störsubstanzen, die möglicherweise jedes Ergebnis unglaubwürdig machen, wenn sie ebenfalls in der Probe vorhanden sind?

Man erhält durch die Validierung ein Gefühl dafür, wann man Ergebnissen trauen darf und wann Vorsicht angebracht ist. Eine Validierung führt aber nicht dazu, dass ein Assay immer nur richtige Ergebnisse liefert. Wir empfehlen in jedem Fall die Orientierung an offiziellen Richtlinien, unabhängig vom „Intended Use“. Dies macht die eigenen Arbeiten für Dritte immer einfach nachvollziehbar und damit glaubwürdig. Auch eine recht kurze und einfache Validierung kann konform

zu Q2A<sup>[1]</sup> und Q2B<sup>[2]</sup> sein. Q2A definiert notwendige Begriffe und Q2B gibt methodische Ratschläge. Zum Thema Begriffs-Definitionen sei hier auf weiterführende spezielle Fachliteratur verwiesen<sup>[3, 4]</sup>.

### FDA-Report

Sofern die Ergebnisse eines ELISA später auch für einen Report bei der FDA verwendbar sein sollen, ist insbesondere der „Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation“<sup>[5]</sup> als Leitfaden hinzuzuziehen. Der Vorteil einer Orientierung hieran ist, dass sich für alle erzeugten Daten eine gute Einschätzbarkeit durch Dritte und letztlich eine hohe Glaubwürdigkeit der Daten ergibt. Dies gilt unabhängig davon, ob ein ELISA für Forschungs- oder Routinezwecke genutzt werden soll. Zu beachten ist, dass dieser Leitfaden kein allgemein verbindliches Vorgehen vorschreibt, sondern lediglich strikte Empfehlungen abgibt, die für den konkreten Einzelfall mit fachlicher Begründung durchaus den praktischen Erfordernissen angepasst werden können.

### Validierungsgrad und Validierungsparameter

Konkret beschreibt der Leitfaden verschiedene Stufen als Full-Validation, Partial-Validation und Cross-Validation. Hierbei wird unterschieden, ob es sich um einen neuen Assay z. B. für ein neues Medikament, einen in den Anforderungen oder der Durchführung veränderten Assay oder um den Vergleich zweier verschiedener Methoden zur Beschreibung desselben Analyten handelt. Die zu validierenden Parameter sind *Selectivity*, *Accuracy*, *Precision*, *Recovery*, *Calibration Curve* and

*Stability of Analyte*. Die Einzelparameter sind bis hin zu Vorschlägen für Probenzahl und für die Akzeptanz prozentualer Abweichungen erläutert.

Auffallend sind die spezifischen Vorgaben für Immunoassays, die sich aus dem Verhalten der Immunoassays in Realproben ergeben. So wird z. B. für die Stabilitätsuntersuchung des Analyten eine „Interference-free Biological Matrix“ gefordert, die jedoch der tatsächlich untersuchten Matrix (also z. B. Blutserum) entsprechen sollte. Schon dies kann bei manchen Analyten zur Herausforderung werden.

Zumindest eine Teil-Validierung wird immer dann gefordert, wenn sich Änderungen der analytischen Prozedur ergeben. Hierzu gehören selbstverständlich auch Änderungen der verwendeten kritischen Materialien wie ELISA-Platten, Tracer oder Puffer. Desweiteren sind Kreuzreaktivitäten verschiedener Natur zu untersuchen. Matrixeffekte sind im Vergleich von biologischer Matrix und reiner Puffermatrix sowie im Rahmen von Verdünnungsexperimenten zu testen. Zusätzlich ist auch unspezifische Bindung zu bestimmen. Daneben gilt als Grundforderung, dass alle in der Validierung genutzten Experimente auch im Bericht zu präsentieren sind. Dies schließt auch die Experimente ein, die ggf. unerwünschte Effekte offenbart haben. Hieraus wird deutlich, dass eine Validierung durchaus erheblichen Umfang annehmen kann, wenn der „Intended Use“ eine genaue Kenntnis der Zuverlässigkeit des Assays erfordert. Somit kann eine Validierung zu einem nicht zu unterschätzenden Kostenfaktor werden.

### Sind Kosteneinsparungen möglich?

Wie lassen sich nun in der Praxis der Validierung Kosten sparen? Die Erfahrung zeigt, dass immer wieder negative Validierungsergebnisse insbesondere im Bereich der Selektivitäten und der Matrixeffekte zur Abänderung von ELISA-Protokollen zwingen. Die Änderungen, die hierbei erforderlich sind, bedingen jedoch eine Revalidierung, bzw. wenigstens Teil-Validierung mit entsprechendem Arbeits-, Kosten- und Dokumentationsaufwand. Bei der Entwicklung führt also das am effizientesten zur Kosten- und Zeit-

ersparnis, was später Revalidierungen reduziert. In zwei Bereichen lassen sich besonders einfach Einsparungen erzielen, der Materialwahl und der Problematik von Selektivität und Matrixeffekten.

### Materialwahl

In der ELISA-Entwicklung ist darauf zu achten, dass man für die Zukunft gleichbleibende Standards für alle verwendeten Materialien und deren Beschaffung sicherstellt. Bei allen Materialien aus Eigenherstellung sollte man bereits zu Beginn der Entwicklung alle Parameter, die auf die Herstellung Einfluss haben, beschreiben und die Einhaltung von Vorgaben bei allen Produktions-Vorgängen kontrollieren. Dies ist am einfachsten durch detaillierte Arbeitsanweisungen sowie ausführliche und standardisierte Arbeitsprotokolle möglich. Jede einzelne Substanz, die z. B. bei der Tracer- oder Puffer-Herstellung benutzt wird, sollte bis hin zu Bestell- und ggf. Chargennummern dokumentiert sein. Der Einkauf entsprechender Fertigwaren ist für viele Labore wirtschaftlicher. Man bekommt Sicherheit, wenn man ausschließlich Waren von zertifizierten Herstellern verwendet und sich ggf. zusätzlich vom Hersteller die Garantie einholt, dass man bei Veränderungen in der Produktion schriftlich informiert wird. Für nahezu alle Materialien, von der Platte bis hin zum Puffer finden sich entsprechende zertifizierte Lieferanten (**Abb. 1**). Nicht ohne Grund ist der Einkauf bei zertifizierten Herstellern im regulierten GLP-Bereich ohnehin Vorschrift.

### Negative Ergebnisse bei Selektivität oder Matrixeffekten

Diese Probleme sind allgemein bekannt, unzählige Male beschrieben worden und treten über kurz oder lang in fast jedem Assay auf. Der Erfolg von Strategien zur Verbesserung der Selektivität und Vermeidung von Matrixeffekten ist natürlich in der Validierung zu untersuchen. Allgemein bekannt und einfach anwendbar sind vor allem die Validierungsmethoden, um Matrixeffekte zu bestimmen. Hier werden in dem „Guidance for Industry“<sup>[5]</sup> der Vergleich von Standardkurven in biologischer Matrix und in reinen Puffern sowie Versuche zur vergleichenden Verdünnungslinearität genannt. Interferenzen, die durch kreuzreagierende Substanzen – also Störer – auftreten können, sind ebenfalls zu untersuchen.

In Bezug auf die Selektivität gibt es neben den für HAMAs (Human Anti-Mouse Antibodies) bekannten, nur sehr speziell wirkenden HAMA-Blockern, Lösungen, die allgemein bei erkannten Problemstellungen anwendbar sind. Hierzu gehören neuartige Proben- bzw. Antikörperverdünnungspuffer wie LowCross, die in vielen Fällen gegen Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekte helfen. Die Erfahrung zeigt, dass durch die Verwendung von adäquaten Proben-Verdünnungspuffern die Gesamtkosten je Probe nur marginal steigen, während die Ergebnis-Zuverlässigkeit stark ansteigt und sich die Aussagekraft der ELISAs erhöht. In vielen Fällen sind durch die Aufhebung von Matrixeffekten sogar deutlich niedrigere Bestimmungsgrenzen möglich. Im Regelfall

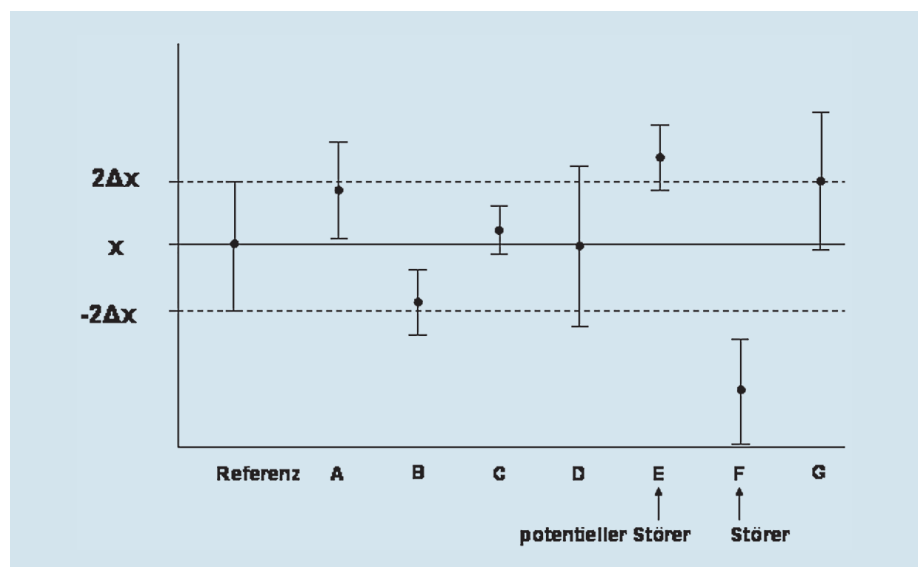
übersteigen die Kosteneinsparungen für Validierungen und Entwicklungsschleifen nach dem Aufdecken von Matrixeffekten um ein Vielfaches die Kosten moderner Puffer-Systeme aus geeigneten Blockierungspuffern und Assaypuffern.

### Störeruntersuchung

Im Rahmen einer Validierung werden Realproben ohne Analyt vermessen, um die Spezifität und Störanfälligkeit des Assays zu untersuchen. Es wird so jedoch nur nach Falsch-Positiven gesucht. Das ist meist nicht ausreichend, da auch falsch-negative und falsch-niedrige Werte unerwünschte und mitunter kritische Falsch-Bestimmungen darstellen. Im Regelfall ist eine Reihe von möglichen Stör-Substanzen von vornherein bekannt, die jeweils einzeln – mitunter auch in Kombination – zu betrachten sind. Man kann hier mit Spike-Experimenten in Realproben ohne Störer und unter definierter Zugabe von Test-Substanzen arbeiten. Dazu setzt man den potenziellen Störer-Proben in einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Konzentration im Messbereich den Analyten zu und vermisst die Proben in Mehrfach-Bestimmung. Zu jeder Probe errechnet man den Mittelwert und das Konfidenzintervall. Nun trägt man die erhaltenen Mittelwerte mit Konfidenzintervall gegen die einzelnen Störer bzw. Störerkombinationen auf. Im Ergebnis erhält man das Diagramm mit den Substanz-spezifischen Konfidenzintervallen, wie in **Abbildung 2** gezeigt. Das Konfidenzintervall der Referenzprobe wird nun



▲ **Abb. 1:** Fertigwaren für ELISAs gibt es in großer Auswahl.



▲ **Abb. 2:** Störeruntersuchung mit A bis G als Test-Substanzen. E ist potentieller Störer und F ist als Störer klar identifiziert.

mit den Konfidenzintervallen der Störproben verglichen. Die Frage ist nun: Überlappen die Konfidenzintervalle?

- Jeder potenzielle Störer, dessen Mittelwert in diesem Vertrauensbereich liegt, ist unauffällig und wird nicht als Störer aufgeführt (Substanzen A-D und G).
- Jeder potenzielle Störer, dessen Mittelwert außerhalb liegt, aber dessen Konfidenzintervall in das Konfidenzintervall der Referenz hineinragt, ist nicht klar als Störer aufgefallen. In diesem Falle sollte man aber in Erwägung ziehen, mit einer deutlich größeren Fallzahl erneut zu messen, um möglichst eine klare Aussage treffen zu können (Substanz E).
- Jeder potenzielle Störer, dessen Mittelwert und gesamtes Konfidenzintervall außerhalb liegt, ist als Störer des Assays eindeutig aufgefallen (Substanz F).

In vielen Fällen hat man klare Aussagen in Bezug auf Störer. In manchen Fällen jedoch wurden nur „potenzielle“ Störer ermittelt. Wieder ist auf Basis des „Intended Use“ und ggf. unter Berücksichtigung der Wirtschaftlichkeit zu entscheiden, ob diese potenziellen Störer z. B. mit höheren Probenzahlen weiter zu untersuchen sind oder nicht. In jedem Fall sind die hier gewonnenen Ergeb-

nisse wesentlicher Teil eines Validierungsberichtes.

### Fazit

Eine Validierung ist niemals objektiv richtig oder falsch. Sie ist allenfalls plausibel. Nach erfolgreicher Validierung ist man immer noch nicht sicher, dass der Assay nicht unter besonderen Umständen zu einem falschen Ergebnis führen kann. Man kann aber das Risiko eines falschen Ergebnisses für den Anwender abschätzbar machen. Validierungen können erhebliche Kosten verursachen und immer wieder kommt es aufgrund aufgedeckter Unzuverlässigkeit der Assays zu erneuten Entwicklungsschleifen und Optimierungen. Da dies so ist, bringt es Kostenvorteile, wenn man schon in der Entwicklung verstärkt darauf achtet, zumindest häufige und unvorhersehbare Ursachen von Fehlern, wie z. B. die besprochenen Störeffekte von vorne herein zu minimieren. Sinnvoll ist es häufig, die Entwicklung und Validierung in ein und demselben, möglichst zertifiziertem, Labor durchführen zu lassen. Wichtig für eine optimale Validierungs-Planung und -Durchführung ist vor allem die völlige Klarheit über den „Intended Use“ des ELISA. Die Auswahl von Richtlinien, an denen man sich orientieren soll, ist ebenfalls immer genau zu definieren.

### Literatur

- [1] ICH Topic Q2A – Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology CPMP/ICH/381/95 (1995), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- [2] ICH Topic Q2B – Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology CPMP/ICH/281/95 (1995), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- [3] Raem, A. M., und Rauch, P., eds: Immunoassays, Elsevier, Heidelberg, in press (2006)
- [4] Kromidas, Stavros. Handbuch Validierung in der Analytik, XXII, 503 Seiten, Wiley-VCH, Weinheim, 2000. Hardcover: ISBN 3-527-29811-8.
- [5] Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation (2001) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm)

### Korrespondenzadresse:

Dr. Peter Rauch  
 Dr. Tobias Polifke  
 CANDOR Bioscience GmbH  
 Mendelstr. 7  
 D-48149 Münster  
 Tel.: 0251-980 2879  
 Fax: 012120-299 616  
[p.rauch@candor-bioscience.de](mailto:p.rauch@candor-bioscience.de)  
[t.polifke@candor-bioscience.de](mailto:t.polifke@candor-bioscience.de)  
[www.candor-bioscience.de](http://www.candor-bioscience.de)

