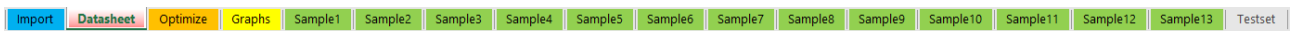
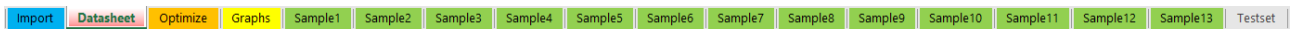


PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel



Inhoud:

1. Doel en strekking / Purpose and scope	2
2. Inleiding / Introduction	2
3. Principe / Principle	3
4. Benodigheden / requirements	6
5. Uitvoering / performance	6
5.1. Algemene aanwijzingen / general instructions	6
5.2. Praktische uitvoering	8
5.2.1. Import sheet	9
5.2.2. Datasheet sheet	10
5.2.3. Optimize sheet	15
5.2.4. Graphs sheet	18
5.2.5. Sample sheets	18
5.2.6. Testset sheet	20
5.2.7. Handmatig invoeren / Manual entry	21
5.3. Beoordeling resultaten	24
6. Literature	26
7. Attachments	26
PLA tredecim als Excel-applicatie: 27-Dec-2018 01:09:18	26



PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

1. Doel en strekking / Purpose and scope

Dit document is de handleiding en bevat de Microsoft Excel worksheet "PLA in Excel".

This document is the manual and contains the Microsoft Excel worksheet "PLA in Excel".

PLA tredecim V01Aug2018											
Sample						Standard					
Dose	Response					Dose	Response				
1/320	1454	1605				1/320	1425	1516			
1/160	1283	1333				1/160	1177	1188			
1/80	953	956				1/80	884	900			
1/40	600	687				1/40	590	681			
1/20	462	511				1/20	461	463			
1/10	250	294				1/10	253	266			

Sample: 0.87 U/mL	Standard name: Std 345
Potency: (0.78 - 0.98) = +/- 12%	Potency: 1 U/mL
Date: 9/17/2018	F-Ratio Limits
Sample name: -	Non-parallelism 2.20 4.75
Lot number: -	Non linearity (S1) 2.31 3.26
Name technician: -	Non linearity (S2) 3.62 3.26
	Rel Slope 1.07 0.90-1.10

2. Inleiding / Introduction

Deze PLA (parallel line assay) rekenmethode is in Microsoft Excel-worksheets geprogrammeerd. Deze applicatie leest ELISA-plaatbestanden in en vult, tot dertien monsters, per monster een PLA-tabblad met gegevens. De resultaten van deze dertien tabbladen worden gegroepeerd in een tabel en voorzien van een kleur, afhankelijk of de statistiek binnen of buiten specificaties valt. Deze PLA-rekenmethode is beschreven door Finney en wordt toegepast in dilution assays. Bij deze bepalingen wordt de respons gemeten per verdunning van een test monster en vergeleken met de respons van dezelfde verdunningen van standaard. Door middel van een variantieanalyse wordt aan de hand van F-toetsen en betrouwbaarheid van de berekende potency de validiteit van het resultaat getoetst.

This PLA (parallel line assay) calculation method is programmed in Microsoft Excel. The program is designed to calculate up to thirteen potencies from data measured in a 8 by 12 ELISA format or from linear lists with data. Results are grouped per sample on thirteen separated sheets or grouped together in one sheet. Depending on the calculated statistics results are flagged with a colour to identify results with statistical results out of specification. The PLA calculation method followed was written by Finney and is designed dilutions assays. The measured response of a dilution of a test sample is compared with the response of the same dilution of a standard. By means of analysis of variance a F-test is calculated and used to validate the calculated potency of the test sample.

PLA tredecim V01Sep2018												
1 Put here the Absorbances (B6 - M13)												
2 If the data are in ASCII then: File, open, select in 'files of type' 'text files' and import the data. Select the proper delimiter to get every absorbance in a separate cell.												
3 Then select the data, press copy and return to this sheet. Put the cursor in cell B6 and press paste.												
4 Absorbance matrix												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825
B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969
C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795
D	253	461	590	909	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568
E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780
F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781
G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931
H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842
7 Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and S5 for the position of the standard.												
8 Sample position matrix Use the abbreviations as entered in column P21 - P 34												
	S5 = standard			S01 - S13 for samples								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05
B	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04
C	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07
D	S5	S5	S5	S5	S5	S5	S06	S06	S06	S06	S06	S06
E	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04
F	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05
G	S5	S5	S5	S5	S5	S5	S06	S06	S06	S06	S06	S06
H	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07
9 Enter here the dilutions of the samples (B36 - M43). Enter a dilution of 1/20 as =1/20 or 0.05												
4 Dilution matrix												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
B	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
C	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
D	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
E	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
F	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
G	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031
H	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031

ID	Name / number	Potency	Unit
S5	S5	12	AE/mL
S01	N0012-18-000001	11.24	AE/mL
S02	N0012-18-000002	11.04	AE/mL
S03	N0012-18-000003	10.49	AE/mL
S04	N0012-18-000004	4.98	AE/mL
S05	N0012-18-000005	4.57	AE/mL
S06	N0012-18-000006	4.77	AE/mL
S07	N0012-18-000007	5.23	AE/mL
S08			
S09			
S10			
S11			
S12			
S13			

Date: 03/Aug/2019	Lot number: -
Name technician: -	

3. Principe / Principle

Het uitgangspunt van de **PLA**-berekening is dat de **logaritme** van de dosis een **lineair** verband vertoont met de gemeten respons.

De parallel line assay is een variant van de slope ratio assay (**SRA**) waar doses uitgezet op een **lineaire** schaal en responsen een **lineair** verband vertonen. In tegenstelling tot de SRA is bij de PLA geen gemeenschappelijk snijpunt van de blankometing.

Bij testen berekend met de PLA-rekenmethode dient de respons zich dus lineair te verhouden met de logaritme van de toegevoegde dosis. Het meetgebied dient zo gekozen te zijn dat standaard en monster hierin een lineair verband vertonen. Essentieel is ook dat de hellingen van de twee berekende lijnen overeenkomen.

The **PLA** calculation is based on the fact that the **logarithm** of the dose has a **linear** relationship with the measured response.

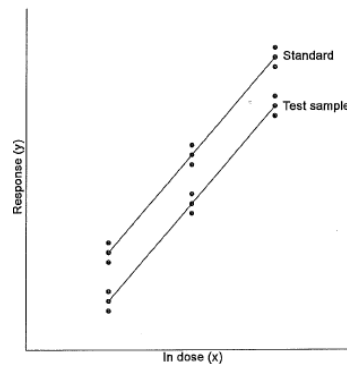
The parallel line assay is a variant of the slope ratio assay (**SRA**) where doses are plotted on a **linear** scale and responses have a **linear** relationship with the doses.

In contrast with SRA, the PLA does not have a common intersection of the blank measurement.

In tests using the PLA calculation method, the response must therefore be linear in relation to the logarithm of the added dose. The measuring range must be chosen such that standard and sample herein have a linear relationship. It is also essential that the slopes of the two calculated lines are match.

De parallel line assay is in zoverre vergelijkbaar met de slope ratio assay dat het beide indirecte analytische rekenmethoden zijn. Zij berekenen een verhouding tussen de standaard en het onbekende testmonster.

Met de PLA-rekenmethode wordt de afstand van twee regressie-lijnen, één regressielijn door de dose-responspunten van de standaard en één regressielijn door de meetpunten van het testmonster, vergeleken.



Example of a PLA

Both SRA and PLA are indirect analytical calculation methods. They calculate a ratio between the potencies of standard and sample.

With PLA a distance between two regression lines is calculated, one thought the standard dose-response points and one regression line through the dose-response points of the sample

De verhouding van de afstand van de twee parallelle lijnen is de relatieve potentie van het testmonster ten opzichte van de gebruikte standaard. De respons is een waarde hoeveel keer geconcentreerder of actiever het testmonster is ten opzichte van de standaard.

The ratio of the distance of the two parallel lines is the relative potency of the sample tested in relation to the used standard.

Response is an amount of how much concentrated or more active the sample is in relation to the standard.

Source of variation	S.S.	DF	M.S.	F RATIO	F 0.95
Preparations	3.34E+03	1	3.34E+03	3.31	
Regression	4.36E+06	1	4.36E+06	4326.61	
Non-parallelism	3.98E+03	1	3.98E+03	3.943	4.75
Non-linearity (s)	2.09E+04	4	5.23E+03	5.185	3.26
Non-linearity (t)	3.59E+04	4	8.96E+03	8.891	3.26
Residual Error	1.21E+04	12	1.01E+03		
Total	4.44E+06	23			

Door middel van variantieanalyse (ANOVA) van de gemeten, meervoudige, responses per dosis (duplo, triplo, enz.) wordt getest op lineariteit en paralleliteit van de twee regressielijnen; lopen ze parallel en zijn ze recht. Variantieanalyse

By means of analysis of variance (ANOVA) of the measured responses of replicates of the standard and sample dilutions the linearity and parallelism is

kan niet worden toegepast op enkelvoudige metingen van een dosis.
 Samen met de relatieve slope (helling) tussen beide berekende hellingen van de test wordt de validiteit van de test beoordeeld.
 Bij de relatieve slope wordt er van uitgegaan dat de twee berekende hellingen, gedeeld op elkaar, 1.0 is, dus een gelijke helling.
 Een spreiding van +/-10% wordt algemeen geaccepteerd, de relatieve helling moet dan tussen de 0.9 en 1.1 liggen. Afhankelijk van de testmethode kunnen deze acceptatiegrenzen aangepast worden.
 Het 95% betrouwbaarheidsinterval van het resultaat wordt berekend met de stelling van Fieller.

tested. Are the lines straight and are they calculated parallel to each other.
 ANOVA cannot be performed on single measurements of dilutions.
 A test is validated on the results of the F-statistics and the calculated relative slope. The relative slope is the slope of the standard divided by the slope of the sample. This is almost identical to the test on parallelism but now it is a value that can be judged. A deviation of 10% is acceptable. Therefore the relative slope must be between 0.9 and 1.1.
 The 95% confidence interval of the result is calculated using Fieller's theorem.

Fieller showed that if a and b are (possibly correlated) means of two samples with expectations μ_a and μ_b , and variances $\nu_{11}\sigma^2$ and $\nu_{22}\sigma^2$ and covariance $\nu_{12}\sigma^2$, and if $\nu_{11}, \nu_{12}, \nu_{22}$ are all known, then a $(1 - \alpha)$ confidence interval (m_L, m_U) for μ_a/μ_b is given by

$$(m_L, m_U) = \frac{1}{(1-g)} \left[\frac{a}{b} - \frac{g\nu_{12}}{\nu_{22}} \mp \frac{t_{r,\alpha}s}{b} \sqrt{\nu_{11} - 2\frac{a}{b}\nu_{12} + \frac{a^2}{b^2}\nu_{22} - g \left(\nu_{11} - \frac{\nu_{12}^2}{\nu_{22}} \right)} \right]$$

where

$$g = \frac{t_{r,\alpha}^2 s^2 \nu_{22}}{b^2}.$$

Het gebruik van de PLA-rekenmethode heeft als voordeel dat over meerdere verdunningen van een testmonster één resultaat berekend wordt en door middel van variantieanalyse een uitspraak wordt gedaan over de kwaliteit van het resultaat. Het berekende resultaat wordt afgekeurd als een toets buiten de statistische grenzen valt.

The use of the PLA calculation method has the advantage that one result is calculated over several dilutions of a test sample and a statement about the quality of the result is made by means of analysis of variance. The calculated result is rejected if a test falls outside the statistical limits.

Het nadeel van PLA vergeleken met de logit-regressiemethode is dat het meetbereik vaak erg klein is. Alleen het lineaire gedeelte van de test kan worden gebruikt. Om deze tekortkoming te minimaliseren kan in dit programma een algoritme voor logit-optimalisatie worden gebruikt. Dit zal een sigmoïde curve lineair maken.

The disadvantage of PLA compared to the logit regression method is that the measuring range is often very small. Only the linearized part of the test can be used. To minimize this shortcoming a logit optimise algorithm can be used in this program. This will linearize a sigmoid curve.

Een simpele PLA-berekening in Excel is in Tabel 1 weergegeven.

A simple PLA calculation in Excel is shown in Table 1.

Een uitgebreide beschrijving van de rekenmethode is beschreven in Statistical Methods in Biological Assay" van D.J. Finney

A detailed description of the calculation method is described in Statistical Methods in Biological Assay "by D.J. Finney

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Tabel 1 PLA without ANOVA

	A	B	C	D	E	F
1	x	y	log(x)	x^2	x*y	
2						
3	4	1	=LOG(A3)	=C3*C3	=C3*B3	
4	8	2	=LOG(A4)	=C4*C4	=C4*B4	
5	16	3	=LOG(A5)	=C5*C5	=C5*B5	
6	32	4	=LOG(A6)	=C6*C6	=C6*B6	
7						
8		=SUM(B3:B6)	=SUM(C3:C6)	=SUM(D3:D6)	=SUM(E3:E6)	
9	=COUNT(A3:A6) nS	=B8/\$A\$9 SyS	=C8/\$A\$9 SxS	=D8-C8^2/\$A\$9 SxxS	=E8-B8*C8/\$A\$9 SxyS	=E9/D9 RS
10						
11	1	1	=LOG(A11)	=C11*C11	=C11*B11	
12	2	2	=LOG(A12)	=C12*C12	=C12*B12	
13	4	3	=LOG(A13)	=C13*C13	=C13*B13	
14						
15		=SUM(B11:B13)	=SUM(C11:C13)	=SUM(D11:D13)	=SUM(E11:E13)	
16	=COUNT(A11:A13) nT	=B15/\$A\$16 SyY	=C15/\$A\$16 SxT	=D15-C15^2/\$A\$16 SxxT	=E15-B15*C15/\$A\$16 SxyT	=E16/D16 RT
17						
18	Slope:	= (E9+E16)/(D9+D16)	relative.slope:	=F16/F9	Potency:	=D19/D20
19	y0	=B9-\$B\$18*C9	x0	=10^(-B19/\$B\$18)		
20	y1	=B16-\$B\$18*C16	x1	=10^(-B20/\$B\$18)		

En de resultaten.

	x	y	log(x)	x^2	x*y	
1						
2						
3	4	1	0.6021	0.3625	0.6021	
4	8	2	0.9031	0.8156	1.8062	
5	16	3	1.2041	1.4499	3.6124	
6	32	4	1.5051	2.2655	6.0206	
7						
8		10.0000	4.2144	4.8934	12.0412	
9	4	2.5000	1.0536	0.4531	1.5051	3.3219
10						
11	1	1	0.0000	0.0000	0.0000	
12	2	2	0.3010	0.0906	0.6021	
13	4	3	0.6021	0.3625	1.8062	
14		=	=	=	=	
15		6.0000	0.9031	0.4531	2.4082	
16	3	2.0000	0.3010	0.1812	0.6021	3.3219
17						
18	slope:	3.3219	rel.slope:	1.0000	potency:	4.0000
19	y0	-1.0000	x0	2.0000		
20	y1	1.0000	x1	0.5000		

18		Relative			
	slope: 3.3219	slope:	1.0000	potency:	4.0000
19	y0 -1.0000	x0	2.0000		
20	y1 1.0000	x1	0.5000		

$$\begin{aligned}
 SxS &= \sum \text{Log}(xS) / nS \\
 SyS &= \sum \text{Log}(yS) / nS \\
 SxxS &= \sum (\text{Log}(xS) * \text{Log}(xS)) / nS \\
 SxyS &= \sum (\text{Log}(xS) * yS) / nS \\
 RS &= SxyS / SxxS \\
 SxT &= \sum \text{Log}(xT) / nT \\
 SyT &= \sum \text{Log}(yT) / nT \\
 SxxT &= \sum (\text{Log}(xT) * \text{Log}(xT)) / nT \\
 SxyT &= \sum (\text{Log}(xT) * yT) / nT \\
 RT &= SxyT / SxxT
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Slope} &= (SxyS + SxyT) / (SxxS + SxxT) \\
 \text{Relative slope} &= RS / RT \\
 y0 &= SyS / (\text{Slope} * SxS) \\
 y1 &= SyT / (\text{Slope} * SxT) \\
 x0 &= 10^{(y0 / \text{Slope})} \\
 x1 &= 10^{(-y1 / \text{Slope})} \\
 \text{Potency} &= x0 / x1
 \end{aligned}$$

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

4. Benodigheden / requirements

- PLA tredecim V01Aug2018.xlsm.
- Windows 7 of Windows 10
- Microsoft Excel 2010 – 2019

5. Uitvoering / performance

5.1. Algemene aanwijzingen / general instructions

De macro's moeten actief zijn om de worksheet te kunnen gebruiken.

Als dit niet het geval is waarschuwt de worksheet bij opstarten met een beveiligingswaarschuwing.

Ga dan in Files -. Options -> Trust center -> Trust center settings -> Macro settings en zet "Enable all macros" aan.

Start geen documenten van onbekende bronnen of zet de optie "Disable all macros with notifications" weer aan

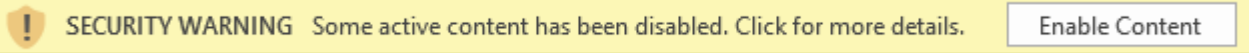
Macros should be enabled for the calculations to run.

If this is not the case, the worksheet warns you when starting with a security warning.

Then go in Files -. Options -> Trust center -> Trust center settings -> Macro settings and enable "Enable all macros".

Be aware that security is low.

Do not open documents of unknown source or turn on "Disable all macros with notifications" again.

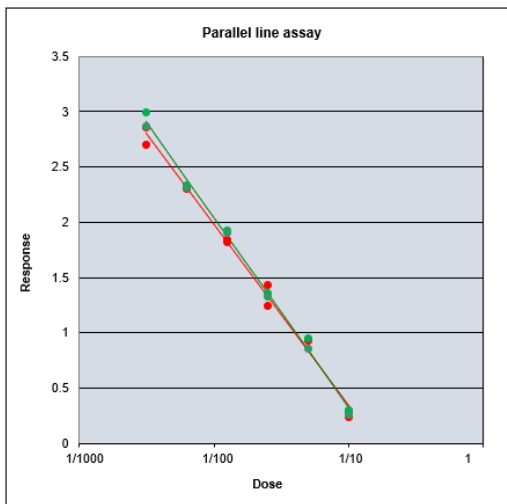


De PLA gebruikt Visual Basic for Application (VBA) algoritmes.

De PLA-berekening en de bijbehorende statistiek wordt in de Sample 1-13 sheets uitgevoerd. In elke Sample sheet is rechts van de grafiek de formules te vinden.

The PLA uses Visual Basic for Application (VBA) algorithms.

The PLA calculation and its statistics is performed in the Sample 1-13 sheets. The formulas can be found to the right of the graph in each Sample sheet.



aantal doses standaard	6
aantal doses test	6
aantal responses standaard	12
aantal responses test	12
som responses standaard	18.898
som responses test	19.382
som Xsi	-21.031
som Xti	-21.031
XSm	-1.753
XTm	-1.753
Ysm	1.575
Ytm	1.615
SxxS:	3.172
SxxT:	3.172
SxyS:	-5.180
SxyT:	-5.441
SyyS:	8.495
SyyT:	9.362
B:	-1.674
t	2.179
s	0.062
g	0.001
var(P)	0.000
limit	-0.033
M	-0.024
MI	-0.057
Mu	0.009

ni	ysi	Xsi	SxxSi
2	5.5550988	-5.0103	1.132738
2	4.621664	-4.40824	0.407786
2	3.6572393	-3.80618	0.04531
2	2.6773832	-3.20412	0.04531
2	1.8655985	-2.60206	0.407786
2	0.521254	-2	1.132738
0	0	0	0

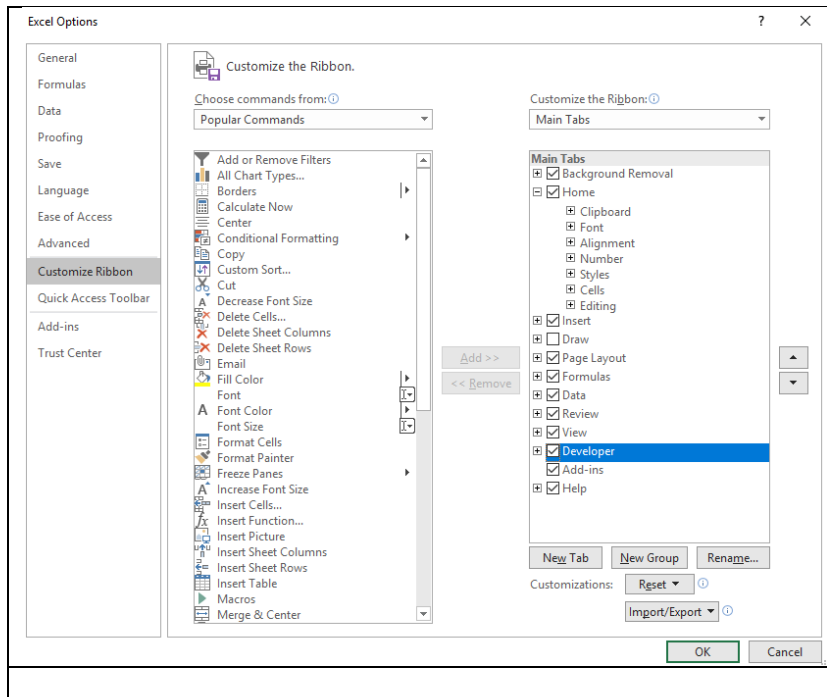
mi	yti	Xti	SxxTi
2	5.8564632	-5.0103	1.132738
2	4.6425711	-4.40824	0.407786
2	3.8315357	-3.80618	0.04531
2	2.6881141	-3.20412	0.04531
2	1.8078792	-2.60206	0.407786
2	0.5557644	-2	1.132738
0	0	0	0

Source of variation	S.S.	DF	M.S.	F RATIO	F 0.95
Preparations	9.76E-03	1	9.76E-03	2.55	
Regression	1.78E+01	1	1.78E+01	4650.97	
Non-parallelism	1.07E-02	1	1.07E-02	2.807	4.75
Non-linearity (s)	3.44E-02	4	8.60E-03	2.250	3.26
Non-linearity (t)	2.66E-02	4	6.65E-03	1.739	3.26

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Om de VBA algoritmen te zien moet in Excel de optie Developer in de ribbon aangezet worden.

To see the VBA coding Developer mode must be turned on in the ribbon.



The screenshot shows the 'Excel Options' dialog box with the 'Customize the Ribbon' tab selected. On the left, the 'Customize Ribbon' section is expanded, and the 'Developer' checkbox is checked. The 'Main Tabs' list on the right also has 'Developer' checked. The 'Customizations' section at the bottom shows 'Import/Export' selected.

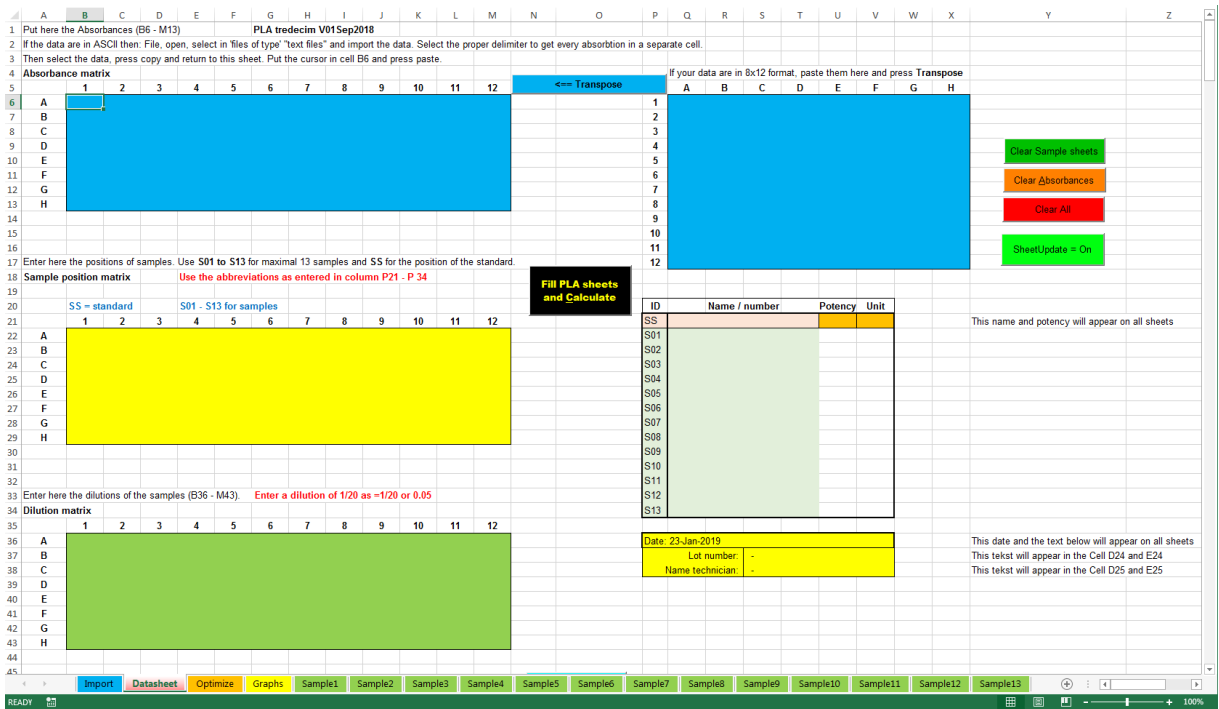
```
|Ed Nieuwenhuys September-November 2017 -  
'V11112017 ParallelLineAssay-3samples-V111  
'V25Jun2018 Final version PLA tredecim V25  
'V25Jun2018V01 added import from lists of  
'V01aug2018 Added Import, Calculate button  
'V01Sep2018 Added Logit optimize  
  
Dim NoDataSheetUpdate As Integer  
Dim Col, Row, RowPos, ColPos, RowPosCursor  
Dim Version As Variant  
  
Sub Init()  
Version = "PLA tredecim V01Sep2018"  
Cells(1, 7).Value = Version  
Range("A1").Select  
NoDataSheetUpdate = True 'Turn scre  
SheetUpdate_Click  
End Sub  
  
Sub BackupAbs()  
For Row = 6 To 13  
For Col = 2 To 13  
Cells(Row + 42, Col).Value = Cells(  
Next  
Next  
End Sub  
  
Private Sub RestoreAbs_Click()  
For Row = 6 To 13  
For Col = 2 To 13
```

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2. Praktische uitvoering

Open in Excel "PLA tredecimV01Sep2018.xlsm".
Het volgende scherm wordt getoond.

Open in Excel "PLA tredecimV01Sep2018.xlsm".
The following screen is displayed.



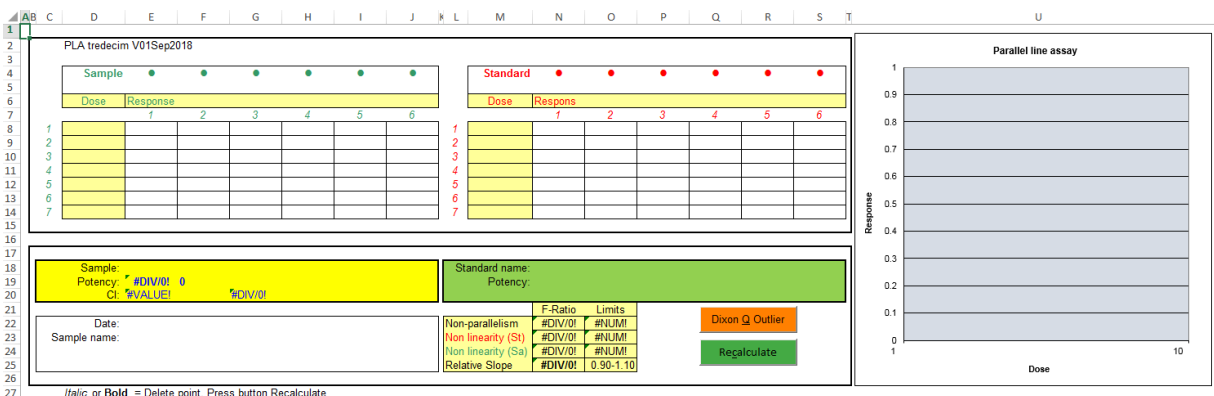
Dit is het invoer- en resultatscherm. Hierin wordt de inzetdefinitie vastgelegd en gekoppeld aan de gemeten responses van een ELISA-plaat. Per monster kunnen bij maximaal zeven doses/verduunningen zes responses worden vastgelegd. Onderin het scherm staan diverse tabbladen.

This is the input and result screen. Herein, the deployment definition is recorded and linked to the measured responses of an ELISA plate. Six responses per sample can be recorded for up to seven doses / dilutions. At the bottom of the screen there are various tabs.



Het is ook mogelijk om de testen met de hand in te voeren. Druk op Sample1 of een andere groene tab tot en met sample13. Zie hoofdstuk: "[Handmatig invoeren](#)"

It is also possible to manually enter the tests. Press Sample1 or another green tab up to and including sample13. See chapter: "[Manual entry](#)"



PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2.1. Import sheet

Met dit tabblad kunnen ELISA-reader bestanden ingelezen worden.

ELISA reader files can be read with this tab.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1			-----								
2			Deze	file	G:\afd-AI2-DA\ANT	AUTOMATISCHMET	LODDER	2017-01-27-15:13:0	bevat	de	meetresultaten
3			van	de	metingen	op	een	ANTHOS	AUTOMATISCH	volgnummer	1
4			De	metingen	zijn	door	de	gebruiker	LODDER	uitgevoerd	
5			op	de	27-01-2017	jaar	-	maand	-	dag	
6			om	15:13:00	uren	:	minuten	:	seconden.		
7			-----								
8			W	405	T	16:14:09					
9				357		353	400	356	352	343	362
10				633		660	570	633	648	605	627
11				909		965	815	930	927	886	863
12				1370		1403	1246	1247	1363	1275	1247
13				1751		1711	1609	1662	1784	1530	1615
14	Import Anthos			1898		1896	1808	1763	2045	1874	1887
15	Import Epoch			611		679	661	617	661	674	630
16				903		877	887	831	888	877	943
17	Import Wizard			1312		1211	1208	1196	1237	1316	1202
18				1656		1482	1500	1444	1630	1503	1456
19	List in B1..B96 to matrix			1776		1721	1629	1807	1677	1666	1661
20				1914		1877	1803	1790	1844	1663	1866
21											

Er zijn knoppen voor een paar gangbare ELISA-readers gemaakt. Als het bestand is ingelezen worden de extincties op de juiste plek in de Datasheet geplaatst.

Import Anthos

Import Epoch

There are buttons for the some ELISA readers. Once the file has been read in, the extinctions are placed in the right place in the Datasheet.

Absorbance matrix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825
B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969
C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795
D	253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568
E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780
F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781
G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931
H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842

De meetgegevens blijven in het Import tabblad staan zodat het originele bestand niet verloren gaat.

The measurement data remains in the Import sheet so the original file is not lost.

De "Import wizard" knop is om files van de Wizard gamma-scintillatieteller in te lezen.

Import Wizard

The "Import wizard" button imports files from the Wizard gamma scintillation counter.

De "List in B1..B96 to matrix"-knop kopieert de alle waarden uit de range B1..B96 naar de Absorbance matrix in het Tabblad Datasheet van A1 naar A12, B1 naar B12, en zo voort.

List in B1..B96 to matrix

The "List in B1..B96 to matrix" button copies all values from the range B1..B96 to the Absorbance matrix in the Datasheet tab from A1 to A12, B1 to B12, and so on.

Absorbance matrix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	67.99	38.54	12024	12716	9866.7	9969.2	7033.2	7417	4409.9	4498.1	2340.8	2338
B	1246.9	1177.9	660.96	633.49	346.53	319.72	2434.9	2482.9	401.15	486.57	30.78	50.59
C	53.49	53.14	68.84	65.98	96.89	80.71	215.39	66.1	12514	6225.4	15618	15718
D	0	8.8										
E												
F												
G												
H												

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2.2. Datasheet sheet

In de "Datasheet" wordt de inzetdefinitie vastgelegd; de positie van elke verdunning/dosis van elk monster. Met deze gegevens worden de "sample sheets" met de PLA geladen. Tot 13 "sample sheets" kunnen gevuld worden.

The deployment definition of an ELISA plate is recorded in the "Datasheet"; the position of each dilution / dose of each sample. With this data the "sample sheets" are loaded with the PLA. Up to 13 sample sheets can be filled.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Extincties invoeren

De "Absorbance matrix" bevat de responses. Bijvoorbeeld extincties of counts. Gerekend wordt met de responses in de range B6:M13.

NB. Als de extincties in een 8x12 of 12x8 formaat in een Excel worksheet zijn opgeslagen dan kunnen de waarden met copy en "paste as values" in het blauwe vlak gekopieerd worden.

In the blue "Absorbance matrix" area the responses are placed. For example extinctions or counts.

Calculations are made with the responses in the range B6: M13.

NB. If the absorbances were entered in another Excel worksheet, the values can be copied with "copy" and "paste as values" in the blue area.

Absorbance matrix												If your data are in 8x12 format, paste them here and press Transpose							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	<== Transpose						
A																			
B																			
C																			
D																			
E																			
F																			
G																			
H																			

Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and SS for the position of the standard.

Absorbance matrix												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825
B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969
C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795
D	253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568
E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780
F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781
G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931
H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842

<== Transpose

Met de "Transpose" knop kunnen waarden in een 8x12 naar een 12 kolommen bij 8 rijen formaat gekopieerd worden.

With the "Transpose" button values in a 8x12 format can be copied to a 12x8 format.

Absorbance matrix												If your data are in 8x12 format, paste them here and press Transpose							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	<== Transpose						
A																			
B																			
C																			
D																			
E																			
F																			
G																			
H																			

Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and SS for the position of the standard.

Absorbance matrix												If your data are in 8x12 format, paste them here and press Transpose								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	<== Transpose							
A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825	259	251	250	253	273	268	266	294
B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969	434	475	462	461	476	469	463	511
C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795	645	628	600	590	674	629	681	687
D	253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568	938	923	953	900	970	947	884	956
E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780	1181	1230	1283	1188	1278	1197	1177	1333
F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781	1524	1428	1454	1516	1555	1596	1425	1605
G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931	534	479	508	554	547	556	530	543
H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842	755	689	693	733	682	748	749	685
													1069	968	924	989	936	1012	1068	928
													1090	1326	1261	1126	1322	1461	1306	1283
													1607	1505	1368	1541	1560	1529	1653	1605
													1825	1969	1795	1568	1780	1781	1931	1842

Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and SS for the position of the standard.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Monstercoderingen invoeren

In de "Sample position" matrix worden de monstercoderingen vastgelegd. De monstercode wordt in de resultatenoverzichtstabel aan de werkelijke monsternaam gekoppeld.

Gebruik de codering **S01** tot **S13** voor de dertien samples.

Gebruik **SS** als codering voor de standaard.

Entering Sample codes

Sample codes are recorded in the "Sample position" matrix.

The sample code is linked to the real sample name in the result overview table. Use the coding **S01** to **S13** for the thirteen samples.

Use **SS** as the standard encoding.

17 Enter here the positions of samples. Use **S01** to **S13** for maximal 13 samples and **SS** for the position of the standard.

18 **Sample position matrix** Use the abbreviations as entered in column P21 - P 34

19

20 **SS = standard** **S01 - S13 for samples**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
21													
22	A	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S04	S04	S04	S04	S04	S04
23	B	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S05	S05	S05	S05	S05	S05
24	C	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S06	S06	S06	S06	S06	S06
25	D	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S07	S07	S07	S07	S07	S07
26	E	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04
27	F	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05
28	G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S06	S06	S06	S06	S06	S06
29	H	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07

ID	Name / number	Potency	Unit
SS	Standaard Lotnr Q2234	1	U/mL
S01	Monster1	0.94	U/mL
S02	Monster2	0.92	U/mL
S03	Monster3	0.87	U/mL
S04	Monster4	0.41	U/mL
S05	Monster5	0.39	U/mL
S06	Monster6	0.41	U/mL
S07	Monster7	0.43	U/mL
S08			
S09			
S10			
S11			
S12			
S13			

Resultatenoverzichtstabel

Result overview table

In het resultatenoverzichtstabel komt de **S01 .. S13**-codering weer terug en wordt er een monsternummer of monsternaam aan gekoppeld.

The S01 .. S13 coding returns in the result overview table and a sample number or sample name is linked in this table to it.

ID	Name / number	Potency	Unit
SS	standard Lotnr QWE987	2	U/mL

In deze tabel moet de naam, lotnummer en concentratie of potency van de gebruikte standaard achter de ID **SS** getikt worden.

In this screen the name, lot number and concentration or potency of the standard used must be entered after the ID **SS**.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Verdunningen invoeren

In de "Dilution matrix" worden verdunningen vastgelegd.

Dat kan in twee formaten; als nummer of als fractie. De formaten zijn in Excel zelf in te stellen.

Houd er rekening mee dat grote verdunningen, zoals 1/5000, 1/10000, de waarde niet goed in de cellen meer past

Overweeg dan om de waarden van **alle** doses in de test een factor 1/1000 groter te maken zodat de waarden weer tussen 1 en 1000 liggen.

Vermeld dan bij de tabel "Verdunning * 1000"

In de template is een "custom" formaat van ??/????? ingesteld.

In de sample sheets is de fractie als default formaat geselecteerd.

Als dit gewijzigd moet worden selecteer dan Sample1 sheet, houd de Shift-toets ingedrukt en selecteer Sample13.

Entering dilutions

Dilutions are recorded in the "Dilution matrix".

This is possible in two formats; as a number or as a fraction. The formats can be changed in Excel itself.

Keep in mind that large dilutions, such as 1/5000, 1/10000, the value no longer fits well in the cells.

Then consider increasing the values of **all** doses in the test by a factor of 1/1000 so that the values are again between 1 and 1000.

Then state in the table "Dilution * 1000"

In the template is a "custom" format of ?? / ????? is made.

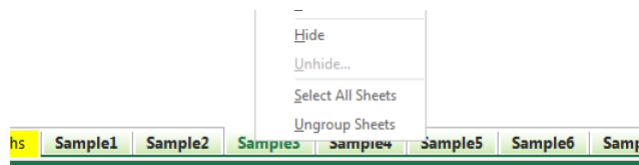
This fraction is selected as the default format in the sample sheets.

If this needs to be changed, select Sample1 sheet, hold the Shift key and select Sample13.



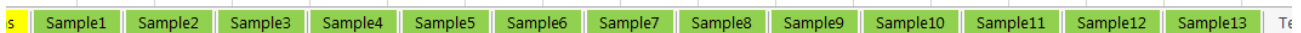
Alle dertien tabs worden dan lichter van kleur. Verander de formats. Klik met rechter muistoets op een tabblad en kies Ungroup Sheets

All thirteen tabs will then become lighter in colour. Change the formats. Right-click on a tab and choose Ungroup Sheets



waarna alle tabbladen weer groen kleuren. jn.

after which all tabs turn green again



33	Enter here the dilutions of the samples (B36 - M43). Enter a dilution of 1/20 as =1/20 or 0.05												
34	Dilution matrix												
35		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
36	A	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
37	B	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
38	C	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
39	D	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
40	E	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
41	F	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
42	G	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
43	H	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.0063	0.0031	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
44													

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Originele ruwe data terugzetten

Onderin de sheet "Datasheet" worden de origineel ingelezen ruwe data bewaard. Door op de knop "Restore Absorbances" te drukken worden deze naar de "Absorbance matrix" boven in de sheet gekopieerd.

Restore original data

At the bottom of the "Datasheet" sheet, the originally imported raw data are saved. By pressing the "Restore Absorbances" button, these are copied to the "Absorbance matrix" at the top of the sheet.

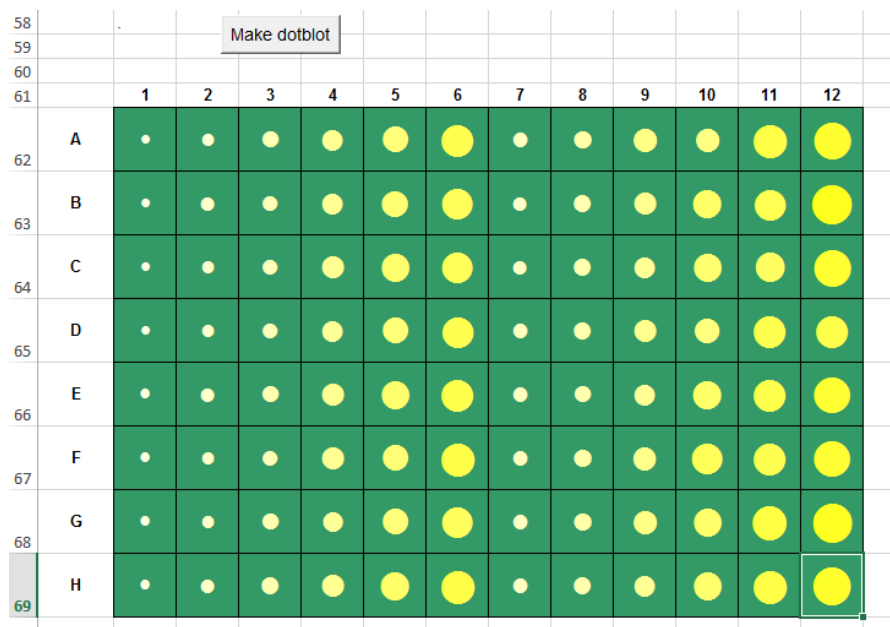
45																	
46		Original absorbances													Restore Absorbances		
47		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
48	A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825				
49	B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969				
50	C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795				
51	D	253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568				
52	E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780				
53	F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781				
54	G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931				
55	H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842				
56																	

Dotblot

De ingelezen extincties worden in de "Absorbance matrix" naar gelang hun sterkte donkerder gekleurd. Met de dotblot wordt de sterkte met een cirkelgrootte en kleur-intensiteit weergegeven

Dot blot

The absorbed readings are coloured in the "Absorbance matrix" according to their strength. With the dot blot the strength is shown with a circle size and colour intensity.



PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2.3. Optimize sheet

Voor een PLA moeten beide dose-respons lijnen recht zijn.

Vaak moet het meetgebied verkort worden omdat anders de F-ratio voor lineariteit buiten de specificaties valt.

Door de vaak sigmoïde lijn recht te maken kan een logit-transformatie op de responses van de standaard de kromme lijnen recht maken.

De gemiddelde responses van de standaard van Sample1 worden met een logit-functie $\log(y / 1 - y)$ gelineariseerd.

Met de berekende formule $\log(\text{response} / (\text{Bmax-response}))$ worden daarna alle responses geconverteerd.

Daarna wordt van alle responses met de laagste waarde van de logit-regressie (Minimum) afgetrokken zodat geen negatieve getallen ontstaan. Dit voorkomt vreemde grafieken en verkeerde beslissingen in de software die test op positieve getallen.

In het voorbeeld hieronder zijn 3 samples afgekeurd op lineariteit.

For a PLA, both dose-response lines must be straight.

Often the measuring range has to be shortened because otherwise the F-ratio for linearity falls outside the specifications.

By straightening the often sigmoid line, a logit transformation on the responses of the standard can straighten the curved lines.

The average responses of the Sample1 standard are linearized with a logit function $\log(y / 1 - y)$.

With the calculated formula $\log(\text{response} / (\text{Bmax-response}))$, all responses are then converted.

Subsequently, all responses with the lowest value of the logit regression (Minimum) are subtracted so that no negative numbers arise.

This prevents strange graphs and wrong decisions in the software that tests for positive numbers.

In the example below three samples are rejected on linearity

Put here the Absorbances (B6 - M13) **PLA tredecim V01Sep2018**

If the data are in ASCII then: File, open, select in 'files of type' 'text files' and import the data. Select the proper delimiter to get every absorbance in a separate cell.
Then select the data, press copy and return to this sheet. Put the cursor in cell B6 and press paste.

Absorbance matrix												If your data are in 8x12 format, paste them here and press							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	<== Transpose						
A	259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825	1	A	B	C	D	E	F
B	251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969	2						
C	250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795	3						
D	253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568	4						
E	273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780	5						
F	268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781	6						
G	266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931	7						
H	294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842	8						

Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and SS for the position of the standard.

Sample position matrix												Fill PLA sheets and Calculate					
	SS = standard			S01 - S13 for samples													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ID	Name / number	Potency	Unit	
A	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05	S05	SS	std	12	AE/mL
B	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04	S04	S01	N0012-18-000001	11.24	AE/mL
C	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07	S07	S02	N0012-18-000002	11.04	AE/mL
D	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S06	S06	S06	S06	S06	S06	S06	S03	N0012-18-000003	10.49	AE/mL
E	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04	S04	S04	N0012-18-000004	4.98	AE/mL
F	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05	S05	S05	N0012-18-000005	4.57	AE/mL
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S06	S06	S06	S06	S06	S06	S06	S06	N0012-18-000006	4.77	AE/mL
H	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07	S07	S07	N0012-18-000007	5.23	AE/mL

Enter here the dilutions of the samples (B36 - M43). Enter a dilution of 1/20 as =1/20 or 0.05

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

PLA tredecim V01Sep2018

Sample	Dose	Response
1	0.003125	1524
2	0.00625	1181
3	0.0125	938
4	0.025	629
5	0.05	434
6	0.1	259

Standard

Dose	Response	
1	0.003125	1425
2	0.00625	1177
3	0.0125	884
4	0.025	590
5	0.05	461
6	0.1	253

Sample: N0012-18-000001	Standard name: std
Potency: 11.239 AE/mL	Potency: 12 AE/mL
CI: (10.39 - 12.16) = +/- 8%	

Date: 8/7/2019	F-Ratio Limits
Sample name: N0012-18-000001	3.94 4.75
Lot number: -	5.19 3.26
Name technician: -	8.89 3.26
	Relative Slope 1.06 0.90-1.10

Dixon Outlier

Parallel line assay

Italic or Bold = Delete point. Press button Recalculate

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Deze functie transformeert de dose-responses van de standaard met een logit-transformatie naar een rechte lijn met de formule:

Logboek (antwoord / (Rmax - antwoord)).

Het algoritme zoekt een Rmax dat de hoogste correlatie oplevert.

Hoe hoger de correlatie hoe rechter de lijn zal zijn.

Na optimalisatie worden de getransformeerde gegevens gekopieerd naar de absorptiematrixtabel in het gegevensblad.

Druk de knop "Fill PLA sheets and Calculate" om de PLA te berekenen.

De originele meetgegevens kunnen weer teruggezet worden met de knop "Restore Absorbances".

This function transforms the dose-responses of the standard with a logit transformation to a linear line with the formula:

$\text{Log}(\text{response} / (\text{Rmax} - \text{response}))$.

The algorithm searches for an Rmax that gives the highest correlation. The higher the correlation the more linear the line will be.

After optimisation the transformed data are copied to the Absorbance matrix table in the Datasheet sheet.

Press the button "Fill PLA sheets and Calculate" to perform the PLA calculations

The original data can be restored by pressing the button "Restore Absorbances".

Standard	I	I	I	I	I	I	I
Dose	Respons						Average
	1	2	3	4	5	6	
0.003125	1524	1596					1560
0.00625	1181	1197					1189
0.0125	938	947					942.5
0.025	629	645					637
0.05	434	469					451.5
0.1	259	268					263.5

Log Dose	Logit response	
-5.768321	0.514399	0.99857 orrelation
-5.0751738	-0.09206	47 oopcount
-4.3820266	-0.49758	2492.66 Bmax
-3.6888795	-1.06923	-2.194 Minimum
-2.9957323	-1.5087	
-2.3025851	-2.13533	

259	434	645	938	1181	1524	534	755	1069	1090	1607	1825
251	475	628	923	1230	1428	479	689	968	1326	1505	1969
250	462	600	953	1283	1454	508	693	924	1261	1368	1795
253	461	590	900	1188	1516	554	733	989	1126	1541	1568
273	476	674	970	1278	1555	547	682	936	1322	1560	1780
268	469	629	947	1197	1596	556	748	1012	1461	1529	1781
266	463	681	884	1177	1425	530	749	1068	1306	1653	1931
294	511	687	956	1333	1605	543	685	928	1283	1605	1842

Put here the Absorbances (B6 - M13) **PLA tredecim V01Sep2018**

If the data are in ASCII then: File, open, select in 'files of type' "text files" and import the data. Select the proper delimiter to get every absorbance in a separate cell.

Then select the data, press copy and return to this sheet. Put the cursor in cell B6 and press paste.

Absorbance matrix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.2588	0.8566	1.3609	1.9081	2.3084	2.8665	1.1137	1.5798	2.1268	2.1612	3.0091	3.4189
B	0.2238	0.967	1.3251	1.8824	2.3871	2.707	0.9773	1.451	1.9591	2.5414	2.8346	3.7378
C	0.2194	0.9328	1.2645	1.9337	2.4722	2.7497	1.0506	1.459	1.8841	2.4369	2.6092	3.3584
D	0.2327	0.9301	1.2425	1.8426	2.3197	2.853	1.1608	1.5376	1.9944	2.2197	2.8953	2.9415
E	0.3177	0.9696	1.4207	1.9624	2.4642	2.9192	1.1444	1.4369	1.9047	2.5349	2.9278	3.3287
F	0.297	0.9513	1.3272	1.9234	2.3342	2.9899	1.1654	1.5664	2.0328	2.7613	2.875	3.3307
G	0.2886	0.9355	1.4349	1.8147	2.302	2.7021	1.1042	1.5683	2.1252	2.5092	3.0907	3.6482
H	0.4013	1.058	1.447	1.9387	2.5527	3.0056	1.1351	1.443	1.891	2.4722	3.0056	3.454

Enter here the positions of samples. Use S01 to S13 for maximal 13 samples and SS for the position of the standard.

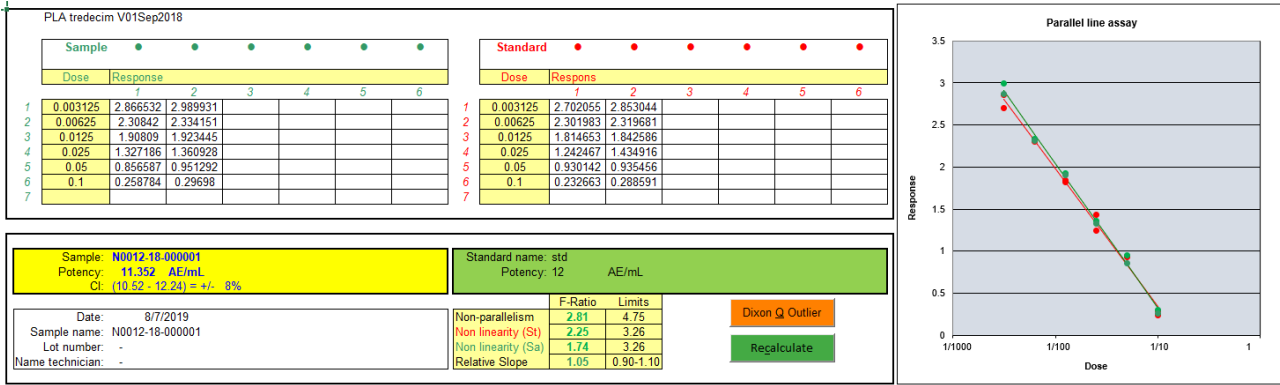
Sample position matrix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05
B	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04
C	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07
D	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S06	S06	S06	S06	S06	S06
E	S02	S02	S02	S02	S02	S02	S04	S04	S04	S04	S04	S04
F	S01	S01	S01	S01	S01	S01	S05	S05	S05	S05	S05	S05
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S06	S06	S06	S06	S06	S06
H	S03	S03	S03	S03	S03	S03	S07	S07	S07	S07	S07	S07

Enter here the dilutions of the samples (B36 - M43). Enter a dilution of 1/20 as =1/20 or 0.05

Dilution matrix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
B	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
D	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
E	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
F	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
G	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
H	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

ID	Name / number	Potency	Unit
SS	std	12	AE/mL
S01	N0012-18-000001	11.35	AE/mL
S02	N0012-18-000002	11.13	AE/mL
S03	N0012-18-000003	10.60	AE/mL
S04	N0012-18-000004	4.76	AE/mL
S05	N0012-18-000005	4.35	AE/mL
S06	N0012-18-000006	4.51	AE/mL
S07	N0012-18-000007	4.96	AE/mL
S08			
S09			
S10			
S11			
S12			
S13			

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel



Optimaliseert de response van de standaard van Sample1 tot een rechte lijn.

Zet de oorspronkelijke responses weer terug en wist de berekende potencies in de Datasheet.

Druk in na een "Logit Optimize" of na herstel van de originele responses weer op de knop om de PLA uit te voeren over alle monsters.

Logit Optimize

Restore Absorbances

Fill PLA sheets and Calculate

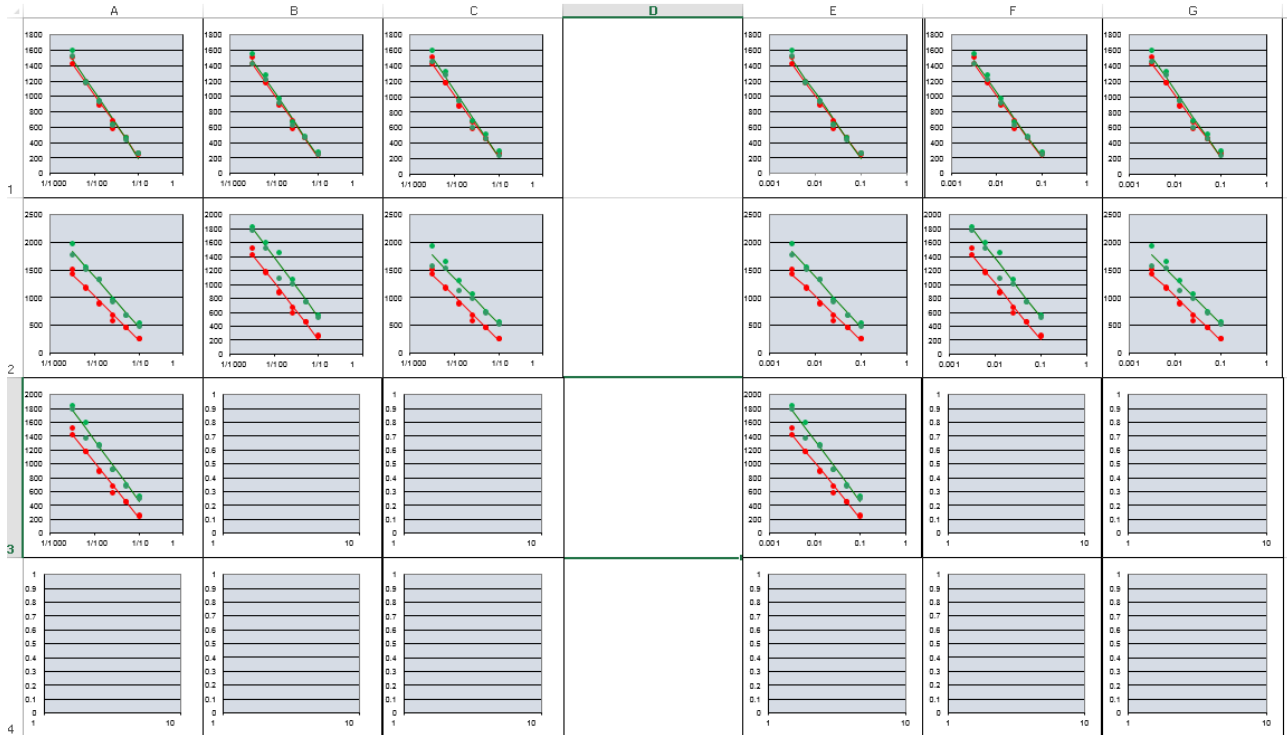
Optimizes the response of the standard of Sample1 to a straight line.

Put the original responses back and erase the calculated potencies in the Datasheet.

After a "Logit Optimize" or after restoring the original responses, press this button again to execute the PLA on all samples.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2.4. Graphs sheet



In dit tabblad is een overzicht van de PLA-grafieken van alle dertien monsters. In de linker helft van de verdunningen als fractie (1/20, 1/100) en in de rechter helft als decimaal getal (0.05, 0.01). De grafieken die niet gebruikt worden kunnen gewist worden zonder dat het berekeningen beïnvloed.

This sheet is an overview of all PLA-graphs of the thirteen samples. In the left half the dilutions as a fraction (1/20, 1/100) and in the right half the same graph as a decimal number (0.05, 0.01). The graphs that are not used can be deleted without affecting calculations.

5.2.5. Sample sheets

Sample		Standard																
Dose	Response	Dose Respons																
1	1524	1	1425	2	1516	3	1177	4	900	5	681	6	461	7	253	8	266	
2	1181																	
3	938																	
4	693																	
5	434																	
6	259																	
7	268																	

Sample: q	Potency: 93.661 U/mL	Standard name: standard Lotnr QWE987	Potency: 100 U/mL
CI: (95.58 - 101.30) = 8%			
Date: 9/19/2018	Non-parallelism: 3.94	Limits: 4.75	Dixon Q Outlier
Sample name: q	Non linearity (St): 5.19	3.26	Regalculate
Lot number: -	Non linearity (Sa): 8.89	3.26	
Name technician: -	Rel Slope: 1.06	0.90-1.10	

De gegevens van elk van de dertien monsters wordt in een eigen tabblad gekopieerd. Elk tabblad heeft zijn eigen formules voor de berekening van de PLA. De tabbladen zijn daardoor afzonderlijk te gebruiken en beïnvloeden elkaar niet. Dit betekent dat als bij de standaard een punt ongeldig wordt gemaakt dit niet bij de overige monsters gebeurt. Meetpunten kunnen ongeldig worden gemaakt door de respons **bold** of *italic* te maken.

Each of the thirteen samples has its own sheet with calculations, graph and results. Therefore calculations of the samples can be treated individual. Removal of a measurement of the standard only influences the results of that particular sample and not the result of the remaining twelve samples. Measuring points can be made invalid if the response is made **bold** or *italic*.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Als daarna **Recalculate** wordt gedrukt wordt een ~~streep~~ door de responses gezet en de PLA opnieuw berekend

After pressing **Recalculate** the measuring point is made invalid and the PLA is recalculated.
The invalid responses are ~~crossed out~~.

1/320	1524	1596
1/160	1181	1197

Als een punt weer valide moet worden gemaakt kan het bold of italic weer ongedaan worden gemaakt en zal na een "Recalculate" de streep door de respons weer verdwijnen.
Het meetpunt wordt weer in de grafiek getoond worden en in de PLA-berekening worden op nieuw uitgevoerd.

If a measuring point has to be made valid again, the bold of italic font can be undone again.
After a "Recalculate" the strikethrough line will disappear.
The measuring point will be shown again in the graph and used in the PLA calculation.

Dixon Q Outlier

Met de Dixon Q Outlier-test kunnen uitbijters gedetecteerd en verwijderd worden.

The Dixon Q outlier test can be used to remove outliers.

'From wikipedia

'In statistics, Dixon's Q test, or simply the Q test, is used for identification and rejection of outliers.

'This assumes normal distribution this test should be used sparingly and never more than once in a data set.

'To apply a Q test for bad data, arrange the data in order of increasing values and calculate Q as defined:

' $Q = \text{Gap} / \text{Range}$

'Where Gap Is the difference between the outlier in question and the closest number to it.

'If $Q > Q_{table}$, where Q_{table} is a reference value corresponding to the sample size and confidence level,

'then reject the questionable point. Note that only one point may be rejected from a data set using a Q test.

'Example

'Consider the data set:

'0.189 , 0.167 , 0.187 , 0.183 , 0.186 , 0.182 , 0.181 , 0.184 , 0.181 , 0.177

'Now rearrange in increasing order:

'0.167 , 0.177 , 0.181 , 0.181 , 0.182 , 0.183 , 0.184 , 0.186 , 0.187 , 0.189

'We hypothesize that 0.167 is an outlier. Calculate Q:

' $Q = \text{gap range} = 0.177 - 0.167 / 0.189 - 0.167 = 0.455$.

'With 10 observations and at 90% confidence, $Q = 0.455 > 0.412 = Q_{table}$, so we conclude 0.167 is an outlier.

'However, at 95% confidence, $Q = 0.455 < 0.466 = Q_{table}$ 0.167 is not considered an outlier.

'This means that for this example we can be 90% sure that 0.167 is an outlier, but we cannot be 95% sure.

'This table summarizes the limit values of the test.

' Number of values:

' 3 4 5 6 7 8 9 10

'Q90: 0.941, 0.765, 0.642, 0.560, 0.507, 0.468, 0.437, 0.412,

'Q95: 0.970, 0.829, 0.710, 0.625, 0.568, 0.526, 0.493, 0.466,

'Q99: 0.994, 0.926, 0.821, 0.740, 0.680, 0.634, 0.598, 0.568

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

5.2.6. Testset sheet

The screenshot displays an Excel spreadsheet with multiple data tables. The top section contains sample positions and standard deviations. The middle section shows a table with columns for 'Name # number', 'Pattern', and 'Unit'. The bottom section includes a 'SheetUpdate' button and a 'Datasheet update' button. The status bar at the bottom indicates 'Count: 8' and '40%' zoom.

Op dit tabblad staan twee testsets.

Voordat de testdata naar de Datasheet gekopieerd kunnen worden moet de knop "Datasheetupdate" in de Datasheet van = On naar = Off gezet worden.



This sheet contains data of two test sets.

Before the test data can be copied to the Datasheet, the button "Datasheet update" in the Datasheet must be switched from = On to = Off.



De PLA Excel workbook controleert voortdurend of gegevens veranderen. Dit blokkeert kopiëren en plakken tussen de sheets. De knop "SheetUpdate" zet dit controleren uit of aan. Een andere optie is om de testset eerst naar een lege Excel te kopiëren en daarna met copy en paste naar de PLA datasheet.

The PLA Excel workbook constantly checks whether data changes. This inhibits copying and pasting between the sheets. The "SheetUpdate" button turns this check on or off. Another option is to first copy the test set to an empty Excel and then with copy and paste to the PLA datasheet.

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

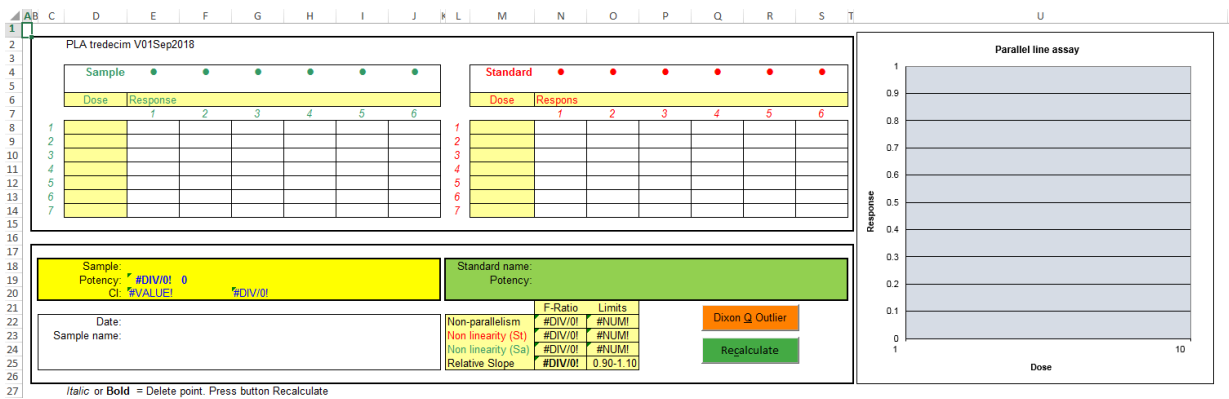
5.2.7. Handmatig invoeren / Manual entry

Druk op een groene tab onderin het scherm.
 Er kunnen dertien van deze identieke tabbladen geopend worden.
 Elk tabblad heeft zijn eigen PLA-berekeningen die te zien zijn rechts van de grafiek.
 Alleen de berekeningen achter de knoppen "Dixon Q Outlier" en Recalculate zijn in Visual basic (VBA) geschreven.

Press one of the green tabs at the bottom of the screen.
 Thirteen of these identical sample tabs can be opened.
 Each tab has its own PLA calculations that can be seen to the right of the graph.

Only the calculations behind the "Dixon Q Outlier" and Recalculate buttons are written in Visual basic (VBA). The following screen appears

Het volgende scherm wordt zichtbaar



Vul in de kolom onder "Dose" de verdunning (1/16) in of hoeveelheid toegevoegd materiaal, bijvoorbeeld ul's.

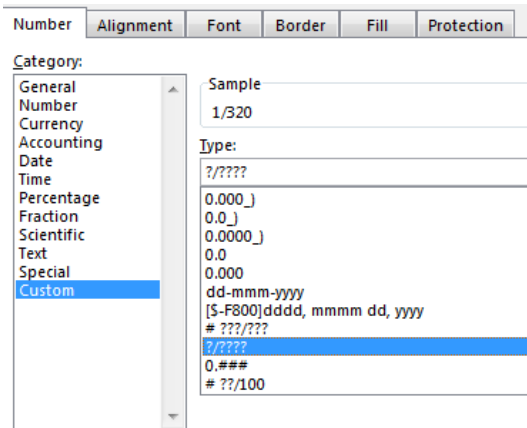
Enter the dilution (1/16) or amount of added material, for example ul's in the column "Dose".

PLA tredecim V01Sep2018					
Sample ● ● ● ●					
	Dose	Response			
		1	2	3	4
1	0.003125	1524	1596		
2	0.00625	1181	1197		
3	0.0125	938	947		
4	0.025	629	645		
5	0.05	434	469		
6	0.1	259	268		
7					

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Verdunning kunnen ook als fractie (1/16) zichtbaar gemaakt worden.
 Bij "format cell -> custom" is een extra formaat ?/???? toegevoegd die verdunning tot 1/9999 kan laten zien.
 Hier kan ook nog bijvoorbeeld ??/?????? toevoegen zodat een verdunning van bijvoorbeeld 22/123456 getoond kan worden

It is possible to make the dilution visible as a fraction (1/16).
 With "format cell -> custom" is an additional format? / ???? added which displays dilutions up to 1/9999.
 Also possible, for example is ?? / ?????? so that a dilution of, for example, 22/123456 can be shown



PLA tredecim V01Sep2018

Sample			
Dose	Response		
	1	2	
1	1/320	1524	1596
2	1/160	1181	1197
3	1/80	938	947
4	1/40	629	645
5	1/20	434	469
6	1/10	259	268
7			

Type the number format code, using one of the existing codes as a star

Vul de gemeten waarden, responses ,achter de juiste dosis, in het blok "Response".

Enter the measured values, responses, behind the proper dosis, in the "Response"

PLA tredecim V01Sep2018

Sample							Standard			
Dose	Response						Dose	Respons		
	1	2	3	4	5	6		1	2	3
1	1/320	1524	1596				1	0.003125	1425	1516
2	1/160	1181	1197				2	0.00625	1177	1188
3	1/80	938	947				3	0.0125	884	900
4	1/40	629	645				4	0.025	590	681
5	1/20	434	469				5	0.05	461	463
6	1/10	259	268				6	0.1	253	266
7							7			

De naam en de potency of activiteit van de standaard wordt in deze velden ingevoerd.

The name and potency or activity of the standard are entered in these fields.

Standard name: std
 Potency: 12 AE/mL

De naam van het monster, testdatum et cetera kunnen in deze velden worden ingevoerd.

The sample name, test date, etc. can be entered in these fields.

Date: 12/14/2018
 Sample name: N0012-18-000001
 Lot number: -
 Name technician: -

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

Responses kunnen ongeldig worden gemaakt door de respons **bold** of *italic* te maken.

Recalculate

Als daarna **Recalculate** wordt gedrukt wordt een ~~streep~~ door de responses gezet en de PLA opnieuw berekend

Responses can be invalidated by making the response **bold** or *italic*.

Recalculate

If **Recalculate** is pressed, a ~~line~~ will be put through the responses and the PLA recalculated

1/320	1524	1596
1/160	1181	1197

Als een punt weer valide moet worden gemaakt kan het bold of italic weer ongedaan worden gemaakt en zal na een "Recalculate" de streep door de respons weer verdwijnen.

Het meetpunt wordt weer in de grafiek getoond worden en in de PLA-berekening worden op nieuw uitgevoerd.

If a measuring point has to be made valid again, the bold of italic font can be undone again.

After a "Recalculate" the strikethrough line will disappear.

The measuring point will be shown again in the graph and used in the PLA calculation.

Dixon Q Outlier

Met de Dixon Q Outlier-test kunnen uitbijters gedetecteerd en verwijderd worden.

The Dixon Q outlier test can be used to remove outliers.

'From wikipedia

'In statistics, Dixon's Q test, or simply the Q test, is used for identification and rejection of outliers.

'This assumes normal distribution this test should be used sparingly and never more than once in a data set.

'To apply a Q test for bad data, arrange the data in order of increasing values and calculate Q as defined:

' $Q = \text{Gap} / \text{Range}$

'Where Gap Is the difference between the outlier in question and the closest number to it.

'If $Q > Q_{table}$, where Q_{table} is a reference value corresponding to the sample size and confidence level,

'then reject the questionable point. Note that only one point may be rejected from a data set using a Q test.

'Example

'Consider the data set:

'0.189 , 0.167 , 0.187 , 0.183 , 0.186 , 0.182 , 0.181 , 0.184 , 0.181 , 0.177

'Now rearrange in increasing order:

'0.167 , 0.177 , 0.181 , 0.181 , 0.182 , 0.183 , 0.184 , 0.186 , 0.187 , 0.189

'We hypothesize that 0.167 is an outlier. Calculate Q:

' $Q = \text{gap range} = 0.177 - 0.167 / 0.189 - 0.167 = 0.455$.

'With 10 observations and at 90% confidence, $Q = 0.455 > 0.412 = Q_{table}$, so we conclude 0.167 is an outlier.

'However, at 95% confidence, $Q = 0.455 < 0.466 = Q_{table}$ 0.167 is not considered an outlier.

'This means that for this example we can be 90% sure that 0.167 is an outlier, but we cannot be 95% sure.

'This table summarizes the limit values of the test.

' Number of values:

' 3 4 5 6 7 8 9 10

'Q90: 0.941, 0.765, 0.642, 0.560, 0.507, 0.468, 0.437, 0.412,

'Q95: 0.970, 0.829, 0.710, 0.625, 0.568, 0.526, 0.493, 0.466,

'Q99: 0.994, 0.926, 0.821, 0.740, 0.680, 0.634, 0.598, 0.568

5.3. Beoordeling resultaten

Als punten ongeldig moeten worden gemaakt kan dat door ze te verwijderen. Dit heeft als groot nadeel dat niet meer te zien is wat de respons was van het verwijderde meetpunt. Een betere methode is om het te verwijderen punt **bold** of *italic* te maken en daarna op de groene knop "Recalculate" te drukken. De respons verdwijnt wel uit de grafiek maar is nog wel zichtbaar in de invoertabel.

Weghalen van uitbijters 'op het oog' is discutabel.

Het is beter om de Dixon Q outlier test te gebruiken.

Of helemaal geen punten weghalen en de test te herhalen.

Realiseer je dat de statistiek 'unbalanced' wordt als meetpunt verwijderd worden. De variantieanalyse gaat er van uit dat alle punten aanwezig zijn.

De paralleliteit en de lineariteit van de twee lijnen en worden beoordeeld door F-toetsen die berekend worden door middel van variantieanalyse (ANOVA). [Zie hoofdstuk 2.2 Principe](#)

Er kunnen een of meerdere criteria gehanteerd worden om de resultaten te beoordelen.

F-toetsen:

Als een F-ratio groter is dan de Limit, ook wel F-norm, genoemd dan geeft dat aan de de helling van de standaard en monster niet overeenkomen of dat de lijn van de standaard rechter is dan die van het monster.

St slaat op de standaard en **Sa** op het monster (Sample).

If measuring points have to be invalidated, it is possible to erase it.

This has the disadvantage it is impossible to see what the response was if the deleted measuring point.

A better method is to make the response **bold** or *italic* and press the green "Recalculate" button.

The response disappears from the graph but is still visible in the input table.

Invalidating outliers 'by eye' is debatable.

It is better to use the Dixon Q outlier test. Or preferable; don't remove points at all and repeat the test.

Realise that the statistic becomes "unbalanced" when measurement points are deleted. The variance analysis assumes that all points are present.

Parallelism and linearity of the two lines are tested by F-tests calculated by means of analysis of variance (ANOVA). [See chapter 2.2 Principle](#)

One or more criteria can be used to assess the results.

F-tests:

If an F-ratio exceeds the Limit, also called the F-norm, it indicates that the regression line have different slopes or the standard is more linear than the sample regression line.

St refers to the standard and **Sa** to the sample.

	F-Ratio	Limits
Non-parallelism	8.67	4.75
Non linearity (St)	2.04	3.26
Non linearity (Sa)	2.40	3.26
Relative Slope	1.15	0.90-1.10

Relatieve slope:

Als de hellingen van standaard en monster (relative slope) meer dan 10% van elkaar afwijken duidt dat op een probleem in de test. In bijna alle gevallen is de F-test op non-parallelism dan ook afwijkend.

Relative slope:

If the slopes of the standard and sample (relative slope) deviates more than 10% from each other it is due to a a problem in the test.

In almost all cases the F test on non-parallelism is also out of specification.

	F-Ratio	Limits
Non-parallelism	1.52	4.75
Non linearity (St)	0.29	3.26
Non linearity (Sa)	0.37	3.26
Relative Slope	0.90	0.90-1.10

De betrouwbaarheid van het resultaat:

Als de reproduceerbaarheid van de meetpunten per dosis slecht is kunnen alle F-toetsen binnen de norm blijven maar is het resultaat onbetrouwbaar. Dit komt tot uitdrukking in de CI (confidence interval) dat ook als percentage ten opzichte van het gemiddelde berekend wordt.

Afhankelijk van de gewenste betrouwbaarheid van het resultaat kan hier een grens voor worden gesteld.

Grenzen tussen de 10% en 20% zijn gangbaar.

The reliability of the result:

If the reproducibility is poor of the measurement points per dose, all F-tests can remain below the norm, but the result will be unreliable.

This is expressed in the CI (confidence interval) of the potency (result).

The confidence interval is also calculated as a percentage relative to the potency.

Depending on the desired reliability, a limit can be set for the CI.

Limits between 10% and 20% are common.

Sample: Sample 5
Potency: 38.108 U/mL
CI: (30.25 - 47.30) = +/- 22%

PLA Tredecim V01Sep2018 in Excel

6. Literature

David J. Finney Statistical Method in biological assay, Third edition 1978, Pag 69-132

7. Attachments



PLA tredecim
V01Sep2018.xlsm

[PLA tredecim als Excel-applicatie: 27-Dec-2018 01:09:18](#)

Dubbeklik op te openen / double click to open