ОЦІНКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ ГЛЮКООКСИДАЗНИМ МЕТОДОМ ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗАТОРА-ФОТОМЕТРА БІОХІМІЧНОГО «BPC BIOSED»

В.Є. Доброва, О.В. Должикова

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: валідаційна процедура, біоаналітична методика, глюкозооксидазний метод, визначення глюкози.

ВСТУП

Вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій встановлюються міжнародним стандартом 180/IEC 17025:2005. Стандартом регламентовано, що коректність та надійність випробувань чи/або калібрувань, що проводяться лабораторією, залежить від багатьох факторів, одним з яких є методи випробовувань і калібрувань та оцінювання їх придатності. Обсяг та спосіб оцінювання придатності (валідації) залежить від мети і умов застосування методу випробувань/калібрувань в конкретній лабораторії [2, 6, 7]. Крім того, вимірювальна лабораторія (ВЛ) має оцінювати придатність методів, розроблених в межах лабораторії та не стандартизованих, а також стандартизованих методів, які використовуються поза цільовою сферою їх поширення або при їх модифікації. Ці вимоги обумовлюють необхідність проведення валідації (оцінювання придатності) методів, що використовуються у ВЛ. Для клініко-діагностичних, біохімічних та інших науково-дослідних лабораторій, які використовують біоаналітичні методики і працюють з біологічними об'єктами, ці вимоги також є нагальними, особливо якщо ці лабораторії мають акредитацію або бажають її отримати.

Враховуючи вимоги стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 [4] до акредитованих лабораторій, в Проблемній лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету (ПЛМД НФаУ) під керівництвом проф. Малоштан Л.М. було розпочато роботу з розробки валідаційної процедури для оцінки придатності біоаналітичних методик.

Розробка валідаційної процедури методики вимірювання глюкози глюкозооксидазним методом за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED» мала за мету довести, що робочі характеристики даної методики відповідають регламентованим, задовольняють встановленим критеріям, а вимірювані за допомогою неї параметри відповідають належним.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідження були обрані референтні розчини глюкози з відомими концентраціями від 5 ммоль/л до 20 ммоль/л. Для встановлення кількості глюкози у розчині був обраний глкозооксидазний метод [5]. Оптична густина розчину визначалася за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED».

Валідація методу повинна включати визначення наступних параметрів: точність, чутливість, специфічність (селективність), стійкість, стабільність, правильність. Враховуючи рекомендації, щодо оцінюваних параметрів обрали: точність методу, селективність, повторюваність (збіжність), лінійність калібрувальної характеристики, межу виявлення (детектування), межу кількісного визначення, чутливість та стабільність методики.

Для визначення кількості глюкози у біологічних рідинах використовували сироватку крові нелінійних щурів масою 180–200 г.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

Розробка процедури валідації біоаналітичної методики вимірювання глюкози глюкозооксидазним методом за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED» має декілька складових [3].

Перш за все, був складений валідаційний сценарій: встановлені особливості даної біоаналітичної методики; проаналізовані параметри, які потрібно оцінювати.

До особливостей цієї методики відноситься те, що вона базується на використанні ензимного реагенту, який входить до тест-набору визначення глюкози у біологічних рідинах, методика є напівавтоматизованою, що значно підвищує чутливість і точність способу визначення глюкози [5].

Згідно [5] ферментативні глюкозооксидазно-перокидазні методи з колориметричним завершенням є більш специфічними, ніж неферментативні. Сечова кислота, глютатіон, креатинін і інші речовини, що містяться у плазмі (сироватці) крові не заважають визначенню глюкози ензимним методом (лише аскорбінова кислота й цистеїн у великих концентраціях можуть впливати на хід аналізу). Отже, дана методика є специфічною.

Враховуючи технічні характеристики біохімічного аналізатору, межа виявлення даної методики обмежується лише характеристиками тест-наборів та становить 0,056 ммоль/л.

Для оцінки придатності методики було вирішено оцінити такі параметри: внутрішньолабораторна відтворюваність та збіжність за основними факторами впливу, правильність методики, лінійність градуювальної характеристики. Крім того, враховуючи вимоги ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 [4], було заплановано провести розрахунки невизначеності вимірювань даної методики.

По-друге, було складено валідаційний план, у якому визначено персонал, що залучається до процедури валідації згідно кваліфікації; надано інформацію та документальне підтвердження щодо належної роботи приладів, які використовуються; обумовлено послідовність експериментів, їх кількість, форми і вигляд їх надання, а також зроблено вибір прийнятних для оцінки статистичних методів обробки результатів вимірювань. Планування експерименту було проведено з метою максимально спростити роботу, враховуючи розумне використання результатів для здійснення оцінок декількох параметрів. Враховуючи те, що кількість потрібних даних може варіюватися, дотримувались рекомендації ДФУ [1], тому було запропоновано для кожної серії робити не менш ніж три виміри.

Після проведення експериментів складено протокол валідації, який включив результати вимірювань, їх обробку, статистичні розрахунки та оцінку критеріїв придатності. Обробка отриманих даних проводилася за допомогою статистичних методів оцінки і визначення критеріїв придатності [4]. Для виключення грубих помилок під час обробки результатів вимірювань проводилась перевірка вибірки на однорідність.

Дослідження параметрів внутрішньо-лабораторної збіжності та відтворюваності проводилось за факторами: оператор-лаборант, час дослідження, тест-набір. Дослідження показали гарну стійкість методики у відповідності до цих параметрів. Для перевірки впливу першого фактора були обрані чотири оператори-лаборанта однакової кваліфікації і проведені чотири серії спостережень на референтному зразку глюкози $C_{ст}$ = 10 ммоль/л. Обрані критерії для оцінки розрахунків. Оцінка розрахунків продемонструвала однорідність дисперсії і довела, що дана методика має внутрішньо-лабораторну збіжність та відтворюваність [3].

Для перевірки впливу другого фактору проведені три серії спостережень стандартного зразка глюкози $C_{ст}$ = 10 ммоль/л у різний час роботи аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BIOSED». Оцінка внутрішньо-лабораторної збіжності і відтворюваності за фактором часу показала, що дисперсії однорідні, і дана методика має внутрішньо-лабораторну збіжність за фактором часу [3].

Для перевірки впливу тест-наборів, що досліджувалися, використовувалися тест-набори: «Реагент» і «FDelisit», які найчастіше застосовуються у ПЛМД НФаУ. У якості зразка, що досліджувався, використовувався стандартний зразок глюкози $C_{ст}$ = 10 ммоль/л. Оцінка внутрішньо-лабораторної збіжності і відтворюваності за фактором тест-набір показала, що точність даної методика не залежить від типу тест-набору. Оцінка рівності середніх значень за допомогою критерію Ст'юдента показала статистичну незначущість відмінностей у результатах вимірів, отриманих за допомогою даних тест-наборів. Це означає, що тест-набір «Реагент» і тест-набір «FDelisit» з довірчою ймовірністю p = 0,95 забезпечують статистично однакове визначення концентрації глюкози за допомогою методу, що атестується [3].

Таким чином, точність даної методики не залежить від оператора, часу й типу тест-набору.

Оцінка правильності методики, проведена за допомогою стандартних зразків, показа-

ла, що для трьох стандартних зразків глюкози $C_{ст1} = 5$ ммоль/л, $C_{ст2} = 10$ ммоль/л, $C_{ст3} = 20$ ммоль/л систематична похибка не є значущою (за заданим критерієм прийнятності Ст'юдента). Отже, дана методика забезпечує правильність вимірювань у межах лабораторії [3].

Оцінка лінійності методики показала, що за заданим критерієм прийнятності лінійна характеристика забезпечує більш адекватну апроксимацію залежності вимірюваної величини від градуювальних концентрацій.

Дослідження глюкози у сироватці крові щурів довели, що рівень глюкози знаходився у межах фізіологічних норм і склав у контрольній групі 4,58±0,15 ммоль/л у дослідній групі 4,46±0,37 ммоль/л за заданим критерієм прийнятності Ст'юдента розбіжностей не виявлено.

Невизначеність вимірювань встановлювалась за допомогою метода контролю на основі стандартних зразків (СЗ). В умовах внутрішньолабораторної збіжності одним оператором на одному й тому ж обладнанні з використанням одного й того же тест-набору проведені вимірювання СЗ глюкози $C_{ст} = 10$ ммоль/л. Розрахована при цьому розширена невизначеність склала:

$$U_p = t_S\left(p, \nu_{эф.}\right) \cdot u_c\left(y_j\right) = 0{,}954275.$$

На заключному етапі був створений валідаційний звіт, який відображає результати валідації та демонструє, що методика має характеристики, які відповідають регламентованим, а отримані за її допомогою результати є надійними з високим ступенем довіри до них.

ВИСНОВКИ

Розроблена валідаційна процедура методики вимірювання глюкози глюкозооксидазним методом за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED».

За даною процедурою було проведено валідацію методики «Визначення глюкози у пробах біологічної рідини глюкозооксидазним методом за допомогою аналізатора біохімічного «BPC BioSED» та доведено, що робочі характеристики методики вимірювання глюкози глюкозооксидазним методом за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED», відповідають регламентованим, задовольняють встановленим критеріям, а вимірювані за допомогою неї параметри відповідають належним.

Валідацію методики проведено за стандартними зразками, при цьому використовувалися стандарт ДСТУ ISO/IEC 17025, а також рекомендації ДФУ, FDA та ILAC.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РЕРІГ, 2001. — 556 с.
2. Доброва В.Е., Малоштан Л.Н. Анализ проблем валидации биоаналитических методик, используемых при фармакологических и клинических исследованиях лекарственных средств // Системи обробки інформації. — 2007. — Вип. 6(64). — С. 29–31.
3. Доброва В.Е., Малоштан Л.Н., Должикова О.В. Валидация методики определения глюкозы в пробах биологической жидкости глюкозооксидазным методом с помощью анализатора-фотометра биохимического «BPC BioSED» // Системи обробки інформації. — 2008. — Вип. 4(71). — С. 92–95.
4. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — С. 425–427.
6. Рекомендації з оцінювання придатності методів випробувань і калібрувань (видання офіційне). — Київ: Виконавчий орган УкрАО. — 2007. — 61 с.
7. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation.// Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001.