

Прикладні аспекти: медико-біологічні вимірювання

УДК 661.12:658.562:615.07

В.Є. Добрава, К.О. Зупанець, С.В. Місюрьова, Н.С. Мазур

Національний фармацевтичний університет, Харків

ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ НА ПРИКЛАДІ ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЯ ГЕМОГЛОБІНУ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ГЕМОГЛОБІНЦІАНІДНИМ МЕТОДОМ

З метою забезпечення якості клініко-лабораторних досліджень в Лабораторії клінічної діагностики Клініко-діагностичного центру Національного фармацевтичного університету визначено особливості, підходи та вимоги до оцінки придатності лабораторних методик, розроблена валідаційна процедура і проведена валідація методики «Визначення концентрації гемоглобіну в біологічних рідинах гемоглобінціанідним методом при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 СТ і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS». Доведено, що робочі характеристики відповідають регламентованим, задовольняють встановленим критеріям.

Ключові слова: валідація, клінічна лабораторна діагностика, гемоглобінціанідний метод, показники збіжності та відтворюваності, розширена невизначеність вимірювань.

Вступ

Однією з форм об'єктивної оцінки стану здоров'я людини та клінічної діагностики хвороб є клінічні лабораторні дослідження, засновані на вивченні за допомогою лабораторних аналітичних процедур складу зразків біологічних матеріалів, узятих у обстежуваних пацієнтів. Результати лабораторних досліджень є основою для оцінки тяжкості хвороби, прогнозу її перебігу, а також ефективності лікування та його корекції при необхідності [6]. Міра відповідності результатів лабораторних досліджень справжньому вмісту досліджуваних аналітів в організмі пацієнтів і очікувана клінічна інформативність лабораторних результатів перебувають у залежності від впливу ряду як внутрішньолабораторних, так і позалабораторних факторів на всіх етапах досліджень [7]. Допущення лабораторних помилок супроводжуються втратою часу і коштів на проведення повторних досліджень, а більш серйозним наслідком може стати постановка невірної діагнозу. Це означає, що до 6% пацієнтів стануть отримувати неправильну терапію, яка може призвести до погіршення стану здоров'я пацієнта, а приблизно 19-ти % пацієнтам будуть призначені непотрібні додаткові дослідження, які передбачають подорожчання і подовження термінів лікування [6].

Саме тому, клініко-діагностична лабораторія повинна розв'язати проблему впровадження та за-

безпечення системи якості як елемента забезпечення процедури оцінки відповідності результатів лабораторних досліджень.

Одним з етапів розробки і впровадження системи якості є проведення валідаційних робіт. Основним об'єктом оцінки стають методики, за допомогою яких проводяться вимірювання тих або інших параметрів в лабораторії, і для того щоб вони гарантували достовірні і точні результати аналізу, передбачена процедура валідації лабораторних методик. Сьогодні відповідно до вимог державного стандарту ДСТУ ISO 17025 рекомендується оцінювати придатність (валідувати): створені/розроблені лабораторією методики, нестандартизовані методики, стандартні методики, що використовуються поза межами цільової сфери їхнього застосування, а також, у випадку розширення та модифікації стандартизованих методик, для підтвердження того, що вони підходять для цільового застосування в лабораторії [3, 4]. Крім того, «The Fitness for Purpose of Analytical Methods EURACHEM Guide» як один з документів, що на міжнародному рівні надає рекомендації стосовно проведення валідації методик, пропонує валідувати всі методики, що застосовуються в лабораторії [10].

Однак, у зв'язку з відсутністю у лабораторній службі медичних установ нашої країни досвіду управління якістю лабораторної діагностики, заснованого на застосуванні принципів спеціалізованого

стандарту з лабораторної медицини ISO 15189-2009 «Лабораторії медичні. Окремі вимоги до якості та компетентності» у фахівців національних лабораторій виникає багато питань стосовно забезпечення якості лабораторних вимірювань [5]. Ефективне вирішення цих питань стає одною з важливих умов при акредитації, а доведення впровадження оцінювання придатності методів в повсякденну діяльність є свідченням технічної компетентності лабораторій [9].

Таким чином, на сьогодні актуальним є дослідження, розробка і впровадження процедур забезпечення якості у Лабораторії клінічної діагностики шляхом проведення валідаційних робіт з оцінки придатності гематологічних методик.

Саме тому на базі Лабораторії клінічної діагностики Клініко-діагностичного центру Національного фармацевтичного університету (ЛКД КДЦ НФаУ) був розроблений валідаційний протокол та проведена валідація ряду гематологічних методик, в тому числі методики визначення концентрації гемоглобіну в біологічних рідинах гемоглобінціанідним методом при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS, які використовуються в лабораторних дослідженнях. Основною метою проведення даних валідаційних робіт з оцінки придатності методики визначення концентрації гемоглобіну було дослідження аспектів забезпечення якості у ЛКД КДЦ НФаУ шляхом визначення робочих характеристик методики і підтвердження, що вони відповідають регламентованим, задовольняють встановленим критеріям, а вимірювані за допомогою неї параметри відповідають належним. Також було проведено порівняння якості та вірогідності визначення концентрації гемоглобіну в біологічних рідинах гемоглобінціанідним методом при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS з метою визначення можливості співставлення отриманих на двох приладах результатів, підтвердження їх точності та достовірності.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися на стандартних зразках – контрольна кров Para 12 Extend з відомими концентраціями гемоглобіну 115,0 г/л, 117,0 г/л, 118,0 г/л, 119,0 г/л, 120,0 г/л; при використанні тест-наборів виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна та реагентів діагностичних для гематологічних аналізаторів виробництва High Technology, Inc., USA. Для встановлення концентрації гемоглобіну у розчині був обраний гемоглобінціанідний метод. Вимірювання проводилися на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS. При обробці

результатів досліджень були використані показники описової статистики та проведено ряд статистичних оцінок. За методикою були визначені валідаційні характеристики: збіжність та відтворюваність, правильність, невизначеність, лінійність методики [2].

Результати та їх обговорення

Процедура валідації методики визначення концентрації гемоглобіну гемоглобінціанідним методом складалася з кількох етапів. Був складений валідаційний сценарій: встановлені особливості даної методики; проаналізовані параметри, які потрібно оцінювати. Враховуючи технічні характеристики автоматичної гематологічної системи і спектрофотометра межа виявлення даної методики обмежується лише характеристиками тест-наборів та становить 30,0 г/л. Коефіцієнт варіації визначення – не більше 2%.

Розроблено валідаційний план та протокол валідації, у якому визначено персонал, що залучається до процедури валідації, згідно кваліфікації; надано інформацію та документальне підтвердження, що до 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 роботи не менш ніж три виміри.

Перш ніж провести дослідження внутрішньолабораторної збіжності та відтворюваності нами був проведений аналіз можливих причин втрати точності при визначенні рівня гемоглобіну та визначено, що основним джерелом втрати точності при роботі на приладах є оператор-лаборант, який виконує дослідження. Фактор впливу температури зовнішнього середовища під час проведення процедури валідації врахований не був, оскільки вона підтримується на референтному рівні шляхом кондиціонування повітря.

Для перевірки впливу фактора «оператор-лаборант» на збіжність та відтворюваність всередині лабораторії два оператора-лаборанта однакової кваліфікації провели по три виміри спостережень на стандартному зразку гемоглобіну $C_{ст}=118,0$ г/л. Результати вимірювань представлені в табл. 1.

Для оцінки збіжності вимірювань, проведених у лабораторії, перевірялася гіпотеза про рівність дисперсій ($H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$) за критерієм Фішера [5, 12]. Було розраховано вибіркоче значення при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT: $F_{0,975} = 1,29/1,0 = 1,29$; і при роботі на спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS: $F_{0,975} = 0,6561/0,64 =$

=1,012. Розраховані значення цього критерію значно менші критичного значення критерію Фішера $F_{0,975}(n_1 = 9, n_2 = 9) = 4,026$, що дозволяє зробити висновок про однорідність дисперсій і належність вибірок до однієї генеральної сукупності, а також вказує на відсутність грубих помилок в роботі приладів та статистично важливих відмінностей при проведенні вимірювань обох операторів-лаборантів.

За результатами вимірювань в табл. 1 представлені розраховані оцінки дисперсій збіжності та відтворюваності при роботі на двох приладах, а також межі збіжності ($r = 2,77 \times \sigma_r$) та відтворюваності ($R = 2,77 \times S_R$).

Таблиця 1

Оцінка збіжності вимірювань при перевірці впливу фактора «оператор-лаборант»

J	ADVIA 60 CT		Спектрофотометр UNICO 2800UV/VIS	
	Оператор 1	Оператор 2	Оператор 1	Оператор 2
1.	119,0	117,0	118,0	120,0
2.	116,0	119,0	119,0	120,0
3.	117,0	117,0	118,0	119,0
4.	118,0	119,0	117,0	120,0
5.	117,0	118,0	118,0	120,0
6.	119,0	116,0	119,0	120,0
7.	119,0	120,0	118,0	118,0
8.	119,0	117,0	119,0	119,0
9.	118,0	118,0	120,0	121,0
10.	118,0	118,0	119,0	119,0
\bar{X}_j	118,0	117,9	118,5	119,6
S_j	1,0	1,14	0,81	0,8
$\bar{\bar{X}}$	117,95		119,05	
σ_r	1,07		0,803	
S_B	0,05		0,55	
S_R	0,733		0,84	
r	2,964		2,225	
R	2,031		2,324	
U_p	6,37		6,31	

Перевірка правильності методики проводилася на стандартних зразках [4] в умовах внутрішньолабораторної збіжності і відтворюваності. Кожна серія вимірювань перевірена на однорідність. Для стандартного зразка гемоглобіну $C_{ст} = 118,0$ г/л одним оператором-лаборантом проведено чотири серії спостережень у різний час роботи автоматичної гематологічної системи ADVIA 60 CT і спектрофотометра UNICO 2800UV/VIS. Було зроблено оцінку систематичної похибки і перевірено її значимість в порівнянні з випадковою за критерієм прийнятності Ст'юдента. Оцінка рівності середніх значень за до-

помогою даного критерію показала статистичну незначимість відмінностей у результатах вимірів, отриманих в різний час роботи обох приладів, що доводить правильність виконання методики і належність вибірок до однієї генеральної сукупності.

Також була розрахована розширена невизначеність вимірювань

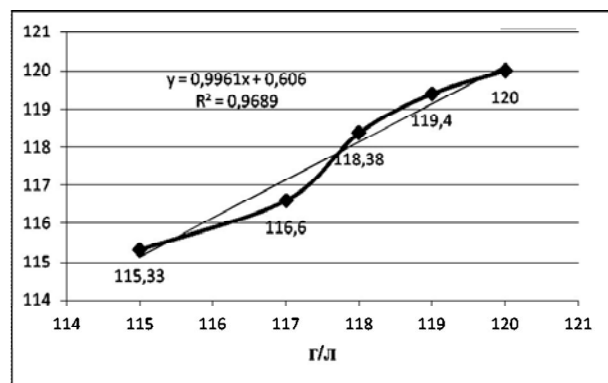
$$U_p = t_S(p, \nu_{эф.}) \cdot u_c(y_j)$$

як метрологічна оцінка придатності. Результати розрахунків представлені в табл. 1.

Розширена невизначеність показала, що в діапазоні $117,95 \pm 6,37$ г/л та $118 \pm 6,31$ г/л відповідно отримані значення рівня гемоглобіну можна вважати точними та достовірними.

При оцінці лінійності методики визначення концентрації гемоглобіну гемоглобінціанідним методом було зроблено 5 серій вимірювань для концентрацій гемоглобіну 115,0, 117,0, 118,0, 119,0, 120,0 г/л. У кожній серії проведено не менше трьох повторних вимірювань. Перевірка лінійності методики показала, що за заданим критерієм прийнятності ($R^2 = 0,9689$) лінійна характеристика забезпечує більш адекватну апроксимацію залежності вимірюваної величини від градуювальних концентрацій.

Розраховані параметри лінійної залежності $Y = 0,606 + 0,9961 \times X$ і побудований градуювальний графік (рис. 1). Розраховано оцінку відповідності отриманої лінійної залежності дійсним даним, яка склала 0,97.

Рис. 1. Градуювальний графік $Y = 0,606 + 0,9961 \times X$

Для можливості у випадку необхідності співставляти результати лабораторних досліджень отримані при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT з даними вимірювань на спектрофотометрі Unico 2800UV/VIS було проведено порівняння отриманих результатів. Вимірювання проводилися в умовах збіжності, відтворюваності та правильності досліджуваної методики. Враховуючи усі вище перераховані дані, було проведено порівняльну оцінку отриманих результатів та валідаційних характеристик і доведено, що результати визначення концентрації гемоглобіну на автоматичній

гематологічній системі ADVIA 60 CT можна співставити з аналогічними, отриманими на спектрофотометрі Unico 2800UV/VIS. Таким чином, вимірювання на цих двох приладах є порівнюваними, точними та достовірними, а результати можна співставляти при медичних дослідженнях.

Висновки

В ході проведення валідаційного дослідження методики «Визначення концентрації гемоглобіну в біологічних рідинах гемоглобінціанідним методом при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS» визначено особливості, підходи та вимоги до оцінки придатності лабораторної методики та ключові моменти виникнення невизначеностей.

Оцінка внутрішньолабораторної збіжності, відтворюваності та правильності методики характеризує налагоджену роботу приладу і відсутність статистично важливих відхилень при проведенні досліджень.

Доведено, що робочі характеристики відповідають регламентованим, задовольняють встановленим критеріям, а вимірювані за допомогою неї параметри відповідають належним.

Шляхом порівняння результатів визначення концентрації гемоглобіну в біологічних рідинах гемоглобінціанідним методом при роботі на автоматичній гематологічній системі ADVIA 60 CT і спектрофотометрі UNICO 2800UV/VIS підтверджено точність та достовірність отриманих даних, можливість їх співставлення у випадку сильної завантаженості лабораторії або при технічній несправності одного з приладів.

Список літератури

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РЕПІГ, 2001. – 556 с.
2. Доброва В.Е. Валідація методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на модели костного мозга крыс / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Е.С. Колесник, К.А. Степанова // Системи обробки інформації: зб. наук. праць. – Х.: ХУ ПС, 2009. – Вип. 5(79). – С. 58-61.
3. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.
4. Евтифеева О.А. Стандартизированная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О.А. Евтифеева, В.А. Георгиянц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.
5. Лабораторії медичні. Окремі вимоги до якості та компетентності.: ISO 15189-2009 – 40 – (Міжнародний стандарт).
6. Мошкин А.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Практ. руководство / А.В. Мошкин, В.В. Долгов. – М.: Медиздат, 2004. – 216 с.
7. Наказ МОЗ України №1003 від 17.11.2010 «План заходів щодо реалізації Концепції управління якістю клінічних лабораторних досліджень на період до 2015 року».
8. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения. Методические указания. – М.: «Ремедиум», 2001. – 16 с.
9. Стандарт Асоціації «Українські акредитовані органи з оцінки відповідності» (УкрАО) 2007. – С. 5.
10. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. – Eurachem, 1998 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: www.eurachem.ul.pt.

Надійшла до редколегії 27.12.2014

Рецензент: д-р техн. наук, проф. І.П. Захаров, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ГЕМОГЛОБИНЦИАНИДНЫМ МЕТОДОМ

В.Е. Доброва, Е.А. Зупанец, С.В. Мисюрева, Н.С. Мазур

В целях обеспечения качества клинико-лабораторных исследований в Лаборатории клинической диагностики Клинико-диагностического центра Национального фармацевтического университета определены особенности, подходы и требования к оценке пригодности лабораторных методик, разработана валидационная процедура и проведена валидация методики «Определение концентрации гемоглобина в биологических жидкостях гемоглобінціанідним методом при работе на автоматической гематологической системе ADVIA 60 CT и спектрофотометре UNICO 2800UV/VIS». Доказано, что рабочие характеристики соответствуют регламентированным, удовлетворяют установленным критериям.

Ключевые слова: валидация, клиническая лабораторная диагностика, гемоглобінціанідний метод, показатели сходимости и воспроизводимости, расширенная неопределенность измерений.

QUALITY ASSURANCE OF HEMATOLOGICAL RESEARCH ON THE EXAMPLE OF VALIDATION METHODS FOR DETERMINING CONCENTRATION OF HEMOGLOBIN IN BIOLOGICAL FLUIDS BY GEMOGLOBINTSIANID

V.E. Dobrova, K.O. Zupanets, S.V. Misyurova, N.S. Mazur

For assurance of the quality of clinical and laboratory research in the laboratory of clinical diagnostics of Clinical and Diagnostics Center of the National University of Pharmacy the features, approaches and requirements for assessing the suitability of laboratory methods were defined, validation procedure and conducted validation of methods «Determination of hemoglobin concentration in biological fluids by gemoglobintsianid when working on automatic hematological system ADVIA 60 CT and spectrophotometer UNICO 2800UV / VIS» were developed. It is approved that performance characteristics correspond to the regimented, satisfy the criteria.

Keywords: validation, clinical laboratory diagnostics, hemohlobintsianid method, indicators repeatability and reproducibility, the expanded uncertainty of measurement.