

УДК 615:7(045)

Е.Т. Володарский¹, Л.А. Кошечая², Е.А. Рамазанова-Стёпкина³

¹ *Национальный технический университет Украины «КПИ», Киев*

² *Национальный авиационный университет, Киев*

³ *Международная школа технического законодательства и управления качеством, Киев*

ПОДХОДЫ К ОЦЕНИВАНИЮ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Показаны подходы к оцениванию количественных результатов биологических испытаний, основанные на рекомендациях международных нормативных документов в части оценивания неопределенности результатов с учетом специфики медикобиологической отрасли.

Ключевые слова: измерительная задача, спецификация измерений, стандартная неопределенность, модельное уравнение.

Введение

Международный стандарт ISO/IEC 17025: 2005 [1], принятый в качестве национального в Украине [2], определяет общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий, желающих продемонстрировать свой профессиональный уровень, способность стабильно получать достоверные результаты. Стандарт содержит только общие требования к компетентности, что во многих случаях вынуждает лабораторию искать рекомендации и разъяснения, соответствующие специфике отрасли лаборатории. Так, для лабораторий медикобиологической отрасли рекомендуется руководствоваться документами [3 – 5]. Однако, эти документы являются рамочными и конкретных инструкций, например, в части оценивания неопределенности полученных результатов, не содержат. Общие рекомендации по оцениванию неопределенности содержатся в руководстве [6], а для испытательных лабораторий в документе [7].

В некоторых случаях сам по себе характер метода испытаний может помешать тщательному, обоснованному с точки зрения метрологии и статистики расчету неопределенности измерения. В подобных случаях необходимо, по крайней мере, попытаться идентифицировать все составляющие неопределенности и провести их разумную оценку, а также принять меры, чтобы форма отчета о результатах не создавала ложного представления о неопределенности. Разумная оценка должна основываться на знании эффективности метода, области измерений, учитывать имеющийся опыт и данные предыдущих оценок на пригодность. Медикобиологические, в том числе и микробиологические испытания как раз и относятся к категории испытаний, не позволяющих выполнять строгий, метрологически и статистически верный расчет значения неопределенности измерения. В таких случаях рекомендовано, например документом [8] оценивать неопределенность результатов, основываясь на данных повторяемости и воспроизводимости, желателен включая показатели смещения. При этом не исключается,

а рекомендуется выявлять отдельные составляющие неопределенности и обеспечивать оценку их вклада в изменчивость результатов. Как руководство [9], так и инструкция [7] предлагают два возможных подхода к оценке неопределенности измерения.

Основная часть

Первый подход заключается в выявлении и количественном определении каждого компонента общей неопределенности, который вносит вклад в общую неопределенность, и комбинирование всех таких вкладов. Такой подход называется «пошаговым» (комбинированная неопределенность), в соответствии с которым выполняется расчет неопределенности путем суммирования данных каждого этапа или серии этапов. Данный подход может быть эффективно использован для выявления и оценки неопределенности на каждом этапе выполнения методики. Некоторые составляющие неопределенности (например, связанные с дозированием, пипетированием, взвешиванием и разбавлением) могут быть оценены таким образом. Другие составляющие (например, связанные со стабильностью пробы и ее подготовкой) не могут быть измерены непосредственно, и их вклад не может быть непосредственно оценен статистическими методами, однако их значительное влияние на изменчивость результатов должно при этом учитываться.

Второй подход заключается в применении данных, полученных ранее на основе внутренних процедур управления качеством, валидации методики, результатов совместных исследований и проверок квалификации на качество проведения испытаний. Эти данные выступают в качестве комбинации компонентов неопределенности, не детализируя причины и источники их возникновения. Такой подход называют «общим» (общая неопределенность). Применение вышеописанной процедуры не предусматривает проведение расчета неопределенности путем суммирования данных каждого этапа или се-

рии этапов. Порядок выражения неопределенности измерения описывается в руководстве для медико-биологических лабораторий в документе [8].

Из проведенного анализа следует, что документы, разработанные для целей оценивания неопределенности медикобиологических результатов, несут лишь общий рекомендательный характер.

На сегодняшний день биологические испытания являются важной и неотъемлемой составляющей контроля качества, например, лекарственных средств. Биологические испытания медицинских препаратов осуществляются с помощью физических и физико-химических методов, в которых используются стандартные процедуры, в частности приготовление растворов, основанное на многократных разведениях в известных пропорциях исходного раствора различными растворителями в соответствии с принятой схемой. Ранее авторами [10, 11] были предложены подходы к оцениванию неопределенности коэффициента разведения, который с очевидностью влияет на конечный результат биологических испытаний. Так, было получено выражение для оценки неопределенности разведения, которое позволяет с учетом метрологических характеристик применяемого измерительного оборудования обоснованно выбирать схему разведения, обеспечивающую с наименьшей неопределенностью реализацию заданного значения.

Согласно стандартам и положениям Фармакопеи Украины [12], устанавливающим нормы качества медицинских препаратов, для проверки их качества необходимо проведение биологических испытаний. Таким образом, биологические и микробиологические методы применяют в тех случаях, когда с помощью физических, химических и физико-химических методов нельзя сделать заключение о качестве медпрепаратов. Неопределенность результатов биологических испытаний значительно больше, чем химических и физико-химических (относительная погрешность биологических определений достигает 20-30 и даже 50%). Биологические методы контроля качества весьма разнообразны. Среди них испытания на токсичность, стерильность, микробиологическую чистоту. Биологическую активность устанавливают, как правило, путем сравнения действия испытуемых и стандартных образцов.

Оценивание показателей токсичности, пирогенности, стерильности [12] и др. производятся косвенно с применением прямых измерений, как правило, массы и объема. Например:

– в соответствии со стандартной операционной процедурой (СОП) определение показателя специфической активности вакцины осуществляют путем сравнения иммуногенной активности компонента препарата с активностью эталонной вакцины, которая калибрована в соответствии с Международным стандартом:

$$A = \lg OD_{50} = \lg D_N - \sigma \left(\sum_i L_i - 0,5 \right);$$

– определение показателя пирогенности в иммунологических препаратах определяется путем измерения повышения температуры тела у кроликов, вызванного внутривенным введением стерильного раствора испытываемого образца лекарственного средства: $dt = |t_{\max} - t_0|$;

– определение показателя специфической активности аллергена туберкулезного очищенного в стандартном разведении заключается в определении индекса специфической активности на сенсibilизированных морских свинках с массой тела от 250 до 350 г:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^{\text{ИП}}}{\sum_{i=1}^N d_i^{\text{СО}}}.$$

Таким образом, исходя из вида исследуемого параметра или свойства, сформулировав измерительную задачу, проведя спецификацию измерений и получив модельное уравнение измеряемой величины, вполне можно применить подходы, изложенные в [6]. В качестве примера можно привести оценивание неопределенности аутентичности вакцины.

Наличие и количество действующего вещества в вакцинах проводят визуальным методом при наличии полос преципитации (иммунной реакции осаждения) в геле и измерением диаметров радиальных зон диффузии, которые пропорциональны количеству антигена. Для определения антигена (аутентичности вакцины) проводят реакцию встречной иммунодиффузии по Оухерлони. С целью количественного определения содержания антигена в исследуемых образцах проводят реакцию радиальной иммунодиффузии по Манчини, при которой используют стандартные моносpezifические антисыворотки и стандартные антигены с известной концентрацией. Антиген формирует кольца преципитации, диаметры которых зависят от концентрации антигена [13].

Полученные результаты используются для построения калибровочной кривой, которая показывает зависимость диаметров преципитатов от концентрации антигенов в исследуемых растворах. Исходя из методики проведения исследования, получим модельное уравнение для определения концентрации антигена:

$$C = x = \frac{y - a}{b},$$

где y – диаметр кольца преципитации, пропорциональный концентрации антигена, а и b – коэффициенты градуировочной характеристики.

При анализе неопределенности выявлены основные источники, которыми являются технические характеристики измерительного оборудования (основная допустимая погрешность измерительной линейки $\pm \Delta_0$ и погрешность отсчета Δd), а также неопределенности коэффициентов a и b .

В качестве оценок входных величин используются $\tilde{y} = f(\Delta_0 + \Delta d)$, а также $\hat{a} = f(\Delta a)$ и $\hat{b} = f(\Delta b)$ – соответственно оценки смещения и

чувствительности градуировочной характеристики $y = a + bx$

$$\hat{a} = \frac{\sum_{i=1}^N \tilde{y}_i \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - \sum_{i=1}^N x_i \tilde{y}_i \cdot \sum_{i=1}^N x_i}{N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2};$$

$$\hat{b} = \frac{\left(N \sum_{i=1}^N x_i \tilde{y}_i - \sum_{i=1}^N x_i \sum_{i=1}^N \tilde{y}_i \right)}{\left(N \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2 \right)},$$

где x_i – значение концентрации стандарта антигена, который вносится в лунку при построении градуировочной характеристики; \tilde{y}_i – диаметр кольца преципитации, образовавшегося после внесения антигена концентрацией x_i ; N – количество точек градуировочной характеристики.

Стандартные неопределенности по типу В, обусловленные основной погрешностью мерной линейки и погрешностью отсчета соответственно равны

$$u(\Delta_0) = \frac{\Delta_0}{\sqrt{3}}; \quad u(\Delta d) = \frac{\Delta d}{2\sqrt{3}}.$$

В соответствии с рекомендациями документа [14] стандартные неопределенности по типу А, обусловленные случайной погрешностью оценок коэффициентов a и b соответственно:

$$u(a) = \sqrt{s_{ад}^2 \cdot \sum_{i=1}^N x_i / \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2 \right)};$$

$$u(b) = \sqrt{s_{ад}^2 \cdot N / \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2 \right)},$$

где $s_{ад}^2 = \frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2$ – дисперсия адекватности

линейной градуировочной характеристики, которая учитывает расхождение между экспериментальными значениями \tilde{y}_i и рассчитанными по построенным градуировочным характеристикам $\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$ диаметров колец при тех же значениях x_i , при которых получены экспериментальные значения.

Суммарная стандартная неопределенность измерения диаметра кольца:

$$u_c(y) = \sqrt{\frac{4\Delta_0 + \Delta d}{12}}.$$

Суммарная стандартная неопределенность концентрации антигена:

$$u_c^2(C) = u_c^2\left(\frac{y-a}{b}\right) = \left[u_c\left(\frac{y}{b}\right) + u_c\left(\frac{a}{b}\right) \right]^2, \quad (1)$$

где первая составляющая

$$u_c\left(\frac{y}{b}\right) = \sqrt{\frac{1}{b^2} u_c^2(y) + \frac{\tilde{y}^2}{b^4} u^2(b)} \quad (2)$$

с учетом коэффициентов влияния $c_y = \frac{1}{b}$; $c_b = \frac{\tilde{y}}{b^2}$.

Вторая составляющая выражения (1)

$$u_c\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\frac{1}{b^2} u^2(a) + \frac{\hat{a}^2}{b^4} u^2(b)} \quad (3)$$

с учетом коэффициентов влияния $c_a = \frac{1}{b}$; $c_b = \frac{\hat{a}}{b^2}$.

Подставляя составляющие (2) и (3) в исходное выражение (1), получим:

$$u_c(C) = \sqrt{\frac{1}{b^2} u_c^2(y) + \frac{\tilde{y}^2}{b^4} u^2(b) - \frac{1}{b^2} u^2(a) - \frac{\hat{a}^2}{b^4} u^2(b)} = \frac{1}{b} \sqrt{u_c^2(y) + \frac{(\tilde{y}^2 - \hat{a}^2)}{b^2} u^2(b) - u^2(a)}.$$

При представлении результата руководством [6] рекомендовано использовать расширенную неопределенность с определенным уровнем доверия.

Как видим, процедура расчета довольно громоздкая, требующая определенной квалификации исполнителей, которыми чаще всего являются специалисты биологических лабораторий, поэтому вычислительные операции лучше выполнять с помощью специальных программ, реализованных в доступной программной среде, например в Excel. Пример расчета представлен на рис. 1.

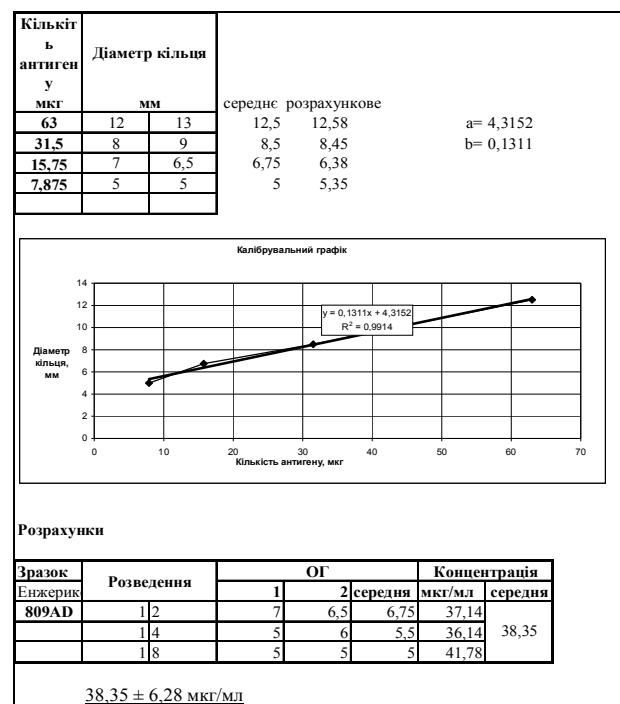


Рис. 1. Расчет неопределенности показателя аутентичности вакцины с помощью программного пакета Excel

При организации автоматизированного рабочего места (АРМ) лаборанта, возможно использование языка графического программирования LabWiew, как показано на рис. 2.

Выводы

Таким образом, используя подходы, рекомендуемые международными документами, можно оценивать неопределенность количественных результатов, полученных при биологических испытаниях. При этом необходимо исследовать процедуру, описанную в соответствующем СОП, представить в виде измерительной задачи, которой должно соответствовать адекватное модельное уравнение, произвести спецификацию измерений, что даст необходимую информацию для оценивания неопределенности.

Список литературы

1. ISO/IEC 17025: 2005. *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий).
2. Загальні вимоги до компетентності виробувальних та калібрувальних лабораторій: (ISO/IEC 17025:2001, IDT):ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. – [Чинний від 2006-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 32 с. – (Національний стандарт України).
3. ISO 15189:2003, *Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence*. (Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности).
4. ISO 15195: 2003, *Laboratory medicine – Requirements for reference measurements laboratories*, (Требования к лабораториям референтных измерений)
5. EA – 4/10: 2002, *Accreditation for Laboratories Performing Microbiological Testing* (Аккредитация микробиологических лабораторий).
6. Руководство по выражению неопределенности измерения: пер. с англ. / Под ред. В.А. Слава. – СПб.: ГП ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 1999. – 126 с.
7. EA – 4/16 *EA Guidelines on the expression of the uncertainty in quantitative testing, 2003* (Руководство по оцениванию количественных результатов испытаний).
8. Руководство PA/PH/OMCL (05) 49 DEF CORR. *Неопределенность измерения. Часть 1. Общая политика*

ПІДХОДИ ДО ОЦІНЮВАННЯ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ

Є.Т. Володарський, Л.О. Кошева, Е.А. Рамазанова-Стьопкіна

Показані підходи до оцінювання кількісних результатів біологічних випробувань, засновані на рекомендаціях міжнародних нормативних документів в частині оцінювання невизначеності результатів з урахуванням специфіки медико-біологічної галузі.

Ключові слова: вимірювальна задача, специфікація вимірювань, стандартна невизначеність, модельне рівняння/

APPROACHES TO THE EVALUATION OF VAGUENESS OF RESULTS OF BIOLOGICAL TESTS

E.T. Volodarsky, L.A. Koshevaya, E.A. Ramazanovna-Stepkina

Shown approaches to the estimation of the quantitative results of biological tests based on the recommendations of international regulations in terms of estimation uncertainty of the results with specific biomedical industry.

Keywords: measurement task, the specification of measurement, standard uncertainty, the model equation.

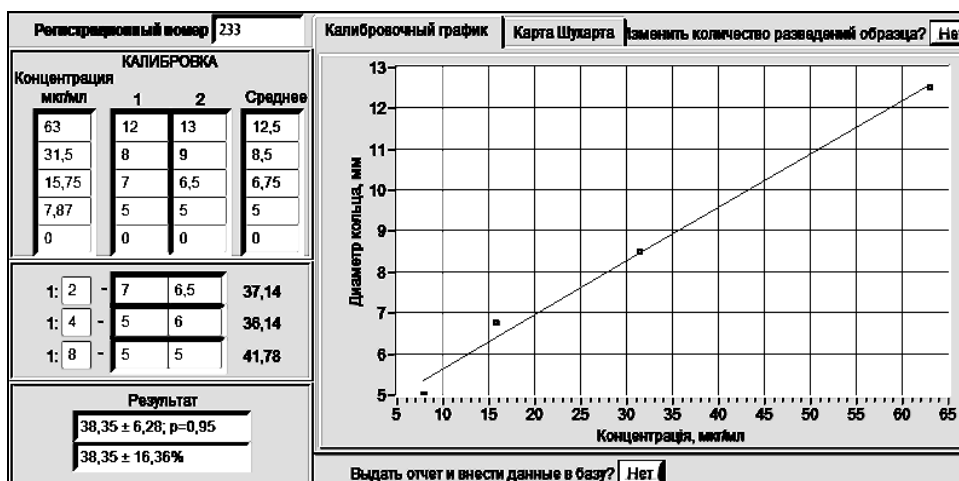


Рис. 2. Вид передней панели интерфейса АРМ, реализованного в LabView

OMLC по использованию неопределенности измерения в испытаниях на подтверждение соответствия. – 2007.

9. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях»: пер. с англ. / Под ред. Л.А. Конопелько. – 2-е изд. – СПб., 2002. – 141 с.

10. Володарский Е.Т. Особенности оценивания неопределенности результатов биологических испытаний / Е.Т. Володарский Л.А. Кошева // Системи обробки інформації: зб. наук. пр. – X.: ХУПС, 2010. – Вип. 4 (85). – С. 142-144.

11. Володарский Е.Т. Уменьшение неопределенности процедуры разведения растворов при аналитических исследованиях / Е.Т. Володарский, Л.А. Кошева // Системи обробки інформації: зб. наук. пр. – X.: ХУПС, 2011. – Вип. 1 (91). – С. 74-77.

12. Державна Фармакопея України. – X.: РІРЕГ, 2008. – 605 с.

13. Стандартная операционная процедура «Определение аутентичности и специфической активности вакцин методом иммунодиффузии».

14. Рекомендация. Метрология. Алгоритмы построения градуировочных характеристик средств измерений состава веществ и материалов и оценивание их погрешностей (неопределенностей): Р 50.2.028-2003. [Введ. с 2004-01-01]. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 24 с.

Поступила в редколлегию 16.01.2012

Рецензент: д-р техн. наук, проф. Ю.П. Мачехин, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков, Украина.