

25 января 2023 г

Вопросы воспроизводимости результатов измерения содержания бактериальных эндотоксинов

Демидова В.В. Руководитель Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр»

Ожерельева А.С – Руководитель Организационного отдела Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр»

Вопрос оценки сходимости результатов измерений содержания эндотоксина – частый вопрос, возникающий при сравнении результатов, полученных в разных лабораториях или даже в одной лаборатории в разное время, в разных опытах. Основное объяснение значительного разброса результатов измерений заключается в том, что ЛАЛ-тест – это биологический анализ, для которого характерна высокая зависимость результатов от множества факторов, влияющих на активность ферментной системы и активность эндотоксинов во время анализа.

Для того, чтобы оценить каким может быть возможный разброс результатов в анализах, проводимых в максимально схожих условиях, были поставлены несколько демонстрационных опытов, задачей которых было проиллюстрировать, каким может быть естественный разброс результатов. В каждом из проведенных опытов какая-то часть условий проведения испытания была предельно унифицирована так, чтобы по возможности максимально снизить влияние факторов, способных оказать влияние на отклонение результатов.

В качестве объекта проверки был выбран образец воды для гемодиализа с небольшим фоновым содержанием эндотоксинов. Причина выбора была очевидной – среда, в которой определяется эндотоксин, должна быть максимально нейтральной, она не должна оказывать никакого ингибирующего воздействия на ЛАЛ-реактив. Проще воды для инъекций в этом смысле не найти. Также нужно, чтобы содержащийся в образце эндотоксин имел естественную природу, такие природные эндотоксины очень стабильны, и их концентрация в растворе не меняется во время хранения. Дополнительный плюс по выбранному образцу - эти образцы (вода для инъекций или вода для гемодиализа) можно проверять без дополнительного

разведения, поскольку образец не ингибирует реакцию, а ожидаемая концентрация эндотоксина находится внутри диапазона калибровочной кривой. Возможность проверки без разведения так же снижает возможность ошибки измерения, связанную с разведениями или манипуляциями с испытуемым образцом.

В этих примерах оценку содержания эндотоксинов проводили с помощью инструментальных анализов, количественные результаты которых дают хорошую возможность статистического сравнения результатов. Калибровочная кривая выбрана была с диапазоном 0,05 - 5 ЕЭ/мл. Короткий диапазон по трем точкам обычно дает хорошую линейность.

Были проведены два опыта, в которых проверялся один и тот же образец, анализы ставили одним и тем же методом с использованием ЛАЛ-реактива одной и той же серии.

Разница между двумя экспериментами заключалась в следующем:

В первом опыте по одной калибровочной кривой измеряли содержание эндотоксинов в образце в пяти повторах.

Во втором опыте тот же образец проверяли по двум калибровочным кривым, при том что оба эти измерения были проведены на одном планшете и в одно и кубирование.

Опыт 1. Параллельная проверка одного и того же образца в одном опыте в нескольких повторах.

Проводили измерение содержания эндотоксина в одном и том же образце в пяти разных повторах. Была подготовлена одна калибровочная кривая.

Условия, которые можно считать одинаковыми в этом опыте:

- Одно оборудование, используемое одновременно.
- Один планшет, в котором проводится инкубирование.
- Проверка по одной калибровочной кривой.
- Опытный образец не разводится, проверяется напрямую.
- Один и тот же сотрудник готовит растворы для калибровки.
- Один и тот же набор дозаторов для дозирования растворов.
- Для проверки используется одна и та же серия ЛАЛ-реактива.

Что можно отнести к отличиям:

- Индивидуальное дозирование испытуемых растворов в лунки планшета.

Результаты

Оценка результатов по критериям достоверности калибровочной кривой

Таблица №1

Калибровка	Коэффициент корреляции r	Допустимое значение	Соответствие
Калибровочная кривая	-1,0000	-≤0,980	Соответствует

Коэффициент корреляции калибровочной кривой оказался очень высоким.

Время реакции по каждому образцу

Таблица №2

Образец (повтор)	1 Время реакции, сек	2 Время реакции, сек	Среднее время реакции, сек.	CV,%
1	1328,4	1329,7	1329,1	0,05
2	1337,8	1333,1	1335,5	0,18
3	1357,9	1335,0	1346,5	0,85
4	1348,1	1335,0	1341,6	0,49
5	1296,2	1310,6	1303,4	0,55

Обращаем внимание на то, что в каждой паре измерений разброс результатов очень незначительный, хотя среднее время реакции для каждого образца отклоняется в пределах 40 секунд, что уже довольно большая разница.

Значение концентрации эндотоксинов, среднее значение, отклонения.

Таблица №3

Образец (повтор)	Концентрация БЭ, ЕЭ/мл
1	0,6186
2	0,6037
3	0,5790
4	0,5899
5	0,6831
Среднее значение	0,6149
СКО	0,04
CV,%	6,7%

Анализ проводился в максимально идентичных условиях, тем не менее результаты концентрации для пяти измерений показали довольно большой разброс результатов – 6,7%.

С точки зрения аналитики на результат могла повлиять точность и прецизионность дозирования образца в лунки планшета. Остальные показатели и параметры были одинаковы для всего опыта. По точности и прецизионности дозирования можно обратиться к нормативам для дозаторов. Так по ГОСТ 28311-2021 прецизионность выраженная в относительной величине рассеяния результатов (стандартного отклонения) относительно величины среднего результата для дозы 100 мкл (стандартной дозой испытуемого образца при составлении реакционной смеси) не должна превышать 2%. Т.е. погрешность при дозировании реакционной смеси составляет менее 2%, а результат измерения содержания бактериальных эндотоксинов при этом имеет разброс 6,7%.

Опыт 2. Один образец в параллели по двум калибровкам в одном опыте

Проводили измерение содержания эндотоксина в одном и том же образце в опыте, в котором для каждого образца строится своя калибровочная кривая. При этом обе калибровки и обе проверки проводились в одном планшете и в одно инкубирование. Это дало возможность провести два параллельных измерения при абсолютно одинаковых условиях подготовки калибровочных растворов и условиях инкубирования/измерения.

Условия, которые точно можно считать одинаковыми в этом опыте:

- Одно оборудование, используемое одновременно.
- Один планшет, в котором проводится инкубирование.
- Растворы КСЭ для калибровочной кривой приготовлены в один проход и применялись для обеих калибровок.
- Опытные образцы не разводятся, проверяются напрямую.
- Один и тот же сотрудник готовит растворы для калибровок.
- Один и тот же набор дозаторов для дозирования растворов.
- Для проверки используется одна и та же серия ЛАЛ-реактива.

Что можно отнести к отличиям:

- Дозирование контрольных растворов для каждой калибровочной кривой индивидуальное.
- Дозирование образцов в лунки планшета – индивидуальное.

Результаты

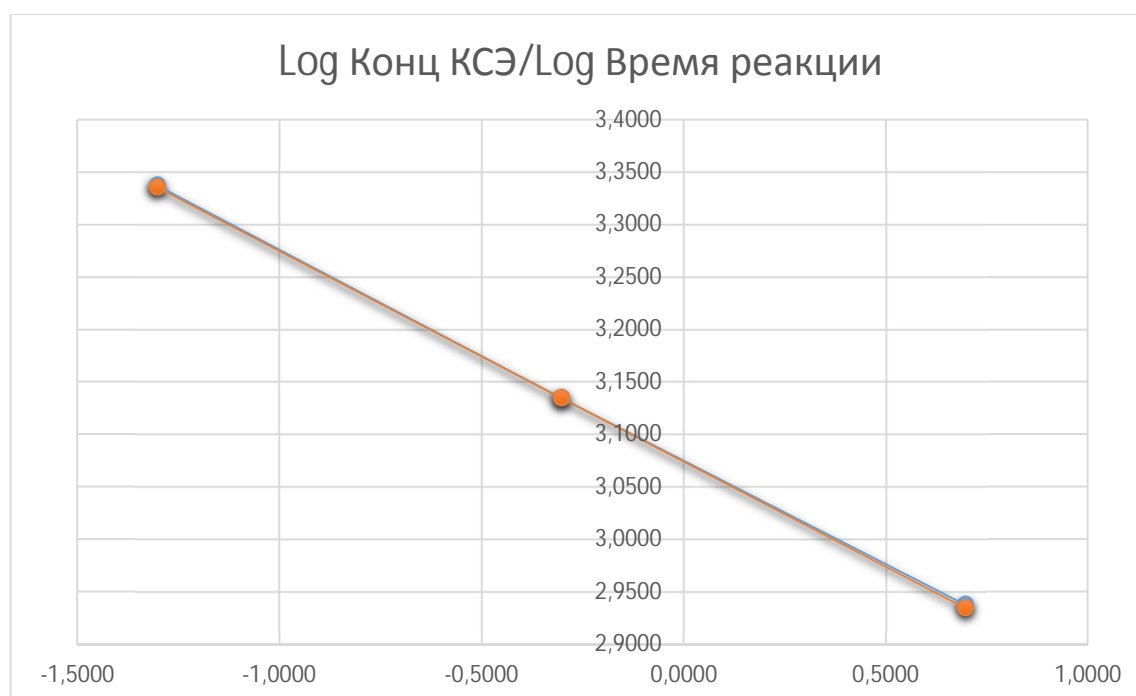
Оценка результатов по критериям достоверности калибровочных кривых

Таблица №4

Калибровка №	Коэффициент корреляции r	Slope	Y-intercept	Время реакции (RT) в сек. для концентрации 1 ЕЭ/мл
Калибровочная кривая 1	-1,0000	-0,1999	3,0761	1191,516
Калибровочная кривая 2	-1,0000	-0,2004	3,0743	1186,588

Сходимость калибровочных кривых оказалась очень высокой. Ниже на диаграмме мы вывели обе кривые на одной координатной сетке. Увидеть разницу расхождения кривых (синяя и оранжевая линии) практически невозможно.

Диаграмма №1



Собственно, этого и следовало ожидать – обе калибровки делались по одним растворам КСЭ, использовался ЛАЛ-реактив одной серии, из одного флакона, разведенный перед опытом.

Совпали не только линейность, но и значения пересечения с осью Y, почти до секунд. Для демонстрации в последней колонке в таблице №4 выведено время реакции (RT) для концентрации 1 ЕЭ/мл, разница составила всего пять секунд. Обе калибровки практически совпали, тем интереснее смотреть на результаты измерения для одного и того же образца по этим двум калибровкам.

Содержание эндотоксинов, измеренное в образце по разным калибровочным кривым

Содержание бактериальных эндотоксинов в двух образцах по двум калибровочным кривым

Таблица №5

Калибровка №	Содержание эндотоксина, ЕЭ/мл
Калибровочная кривая 1	0,3571
Калибровочная кривая 2	0,4354

Разницу значений определила разница времени реакции – одинаковая концентрация эндотоксина в образце прореагировала с одним и тем же ЛАЛ-реактивом за разное время.

Таблица №6

Калибровка №	1 Время реакции, сек	2 Время реакции, сек	Средне время реакции, сек	CV%
Калибровочная кривая 1	1471,4	1456,5	1463,95	0,51%
Калибровочная кривая 2	1415,0	1388,2	1401,6	0,96%

Обращаем внимание на то, что в каждой паре измерений разброс результатов очень незначительный, примерно такой же как и в первом опыте, коэффициент вариации времени реакции не превышает 1%. Разница же значений времени реакции для каждого образца составила уже существенные 60 секунд.

Для двух измерений содержания эндотоксинов полученные результаты можно обобщить следующим образом:

Таблица №7

Среднее значение по 2 измерениям	0,3963 ЕЭ/мл
СКО	0,0553
CV%	14%

При том, что анализ проводился в максимально идентичных условиях, результаты концентрации в двух измерениях показали уже довольно большой относительный разброс результатов, коэффициент вариации составил 14%.

Обобщение результатов по опытам 1 и 2

Всего было проведено 7 измерений концентрации эндотоксина для одного и того же образца. Измерения проводились в двух опытах, одним методом, на одном оборудовании и с помощью одно и того же ЛАЛ-реактива (одной серии).

Суммарная таблица результатов.

Таблица №8

Измерение	Опыт 1, ЕЭ/мл	Опыт 2, ЕЭ/мл	Опыты 1 и 2, ЕЭ/мл
1	0,6186		0,6186
2	0,6037		0,6037
3	0,5790		0,5790
4	0,5899		0,5899
5	0,6831		0,6831
6		0,3571	0,3571
7		0,4354	0,4354
Среднее значение	0,6149 ЕЭ/мл	0,3963 ЕЭ/мл	0,5524 ЕЭ/мл
СКО	0,04	0,06	0,11
CV%	6,7%	14,0%	20,6%

Стоит обратить внимание на значение коэффициента вариации, CV, это относительная величина, выраженная в процентах.

Наименьшее значение коэффициента вариации получено в самой очевидной ситуации – по одной калибровке пять раз измерили один и тот же образец. И даже при такой, казалось бы, полностью унифицированной схеме проверки разброс результатов составил целых 6,7%.

В опыте с двумя измерениями по двум калибровкам при значительной унификации условий измерения, давших очень высокую сходимость характеристик калибровочных кривых – одна и та же серия разведений КСЭ, использованная для построения калибровочных кривых, анализ в одном планшете и в одно инкубирование – разброс результатов составил уже 14%.

Наконец, при сравнении всех результатов, полученных в этих двух опытах в двух инкубированиях, проведенных в разное время, разброс результатов выходит уже на привычные нам 20-35%. Это довольно большой разброс результатов, укладываемый правда в допустимую погрешность измерения. Так, если принять среднее значение для 7 измерений

равное 0,5524 ЕЭ/мл за истинное значение, среднее отклонение составило 20,6%, а разброс максимального/минимального результатов был больше и оказался ближе к классическому интервалу 50-200% от измеренной величины.

Таблица №9

Измерение	Содержание БЭ, ЕЭ/мл	В % от среднего значения
1	0,6186	112%
2	0,6037	109%
3	0,5790	105%
4	0,5899	107%
5	0,6831	124%
6	0,3571	65%
7	0,4354	79%
Среднее значение	0,5524	100%
мин	0,3571	65%
макс	0,6831	124%

Нам кажется, что приведенные примеры помогают понять почему в опытах, проводимых при контролируемых условиях, на поверенном и калиброванном оборудовании могут получаться результаты по содержанию бактериальных эндотоксинов сильно отличающиеся друг от друга. А также почему специалисты, кто постоянно работает с ЛАЛ-тестом, относятся к таким отличиям спокойно и не считают, что, если два результата отличаются друг от друга на десятки процентов, необходимо сразу активировать поиск причин получения OOS-результатов и начинать работу над ошибками.