

О возможности использования рутинных биохимических методик для исследования альтернативных биологических жидкостей человека

С. И. Мурский, ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, врач клинической лабораторной диагностики КДЛ клиники

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Самара

On possibility of using routine biochemical techniques for research of alternative biological human liquids

S. I. Murskiy

Samara State Medical University, Samara

Резюме

Биохимические исследования альтернативных биологических жидкостей человека не распространены в лабораторной практике ввиду отсутствия валидации методик. Целью исследования являлось проведение на примере спермоплазмы валидирующих мероприятий для рутинных биохимических методов исследования на автоматическом биохимическом анализаторе. Исследования проводились на автоматическом биохимическом анализаторе cobas Integra 400 plus (Roche, Швейцария) с применением оригинальных реактивов Roche (Швейцария). Материалами для исследования являлись 30 образцов спермальной плазмы, полученной от клинически здоровых мужчин репродуктивного возраста. Планирование и организация валидирующих мероприятий проводились согласно ГОСТ ISO 15189-2015. Функциональные характеристики методик определялись в соответствии с приказом Минздрава России № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации», протоколами Института клинических лабораторных стандартов CLSI (США). Удалось установить приемлемые уровни линейности, прицезионности и специфичности для 31 из 33 исследуемых аналитов. Также эмпирическим путем была установлена степень необходимого разведения для 12 показателей. Установление аналитической надежности биохимических методик исследования спермоплазмы открывает новые возможности для изучения метаболических характеристик данной биологической жидкости, а значит, и расширяет спектр возможностей ее использования в качестве объекта лабораторных исследований.

Ключевые слова: валидация, аналитическое качество, спермоплазма.

Summary

Biochemical studies of alternative human biological fluids are not common in laboratory practice due to the lack of validation methods. The aim of the study was to validate on semen plasma routine biochemical research methods using an automatic biochemical analyzer. The studies were carried out on a Cobas Integra 400 plus automatic biochemical analyzer (Roche, Switzerland) using original Roche reagents (Switzerland). Materials for the study were 30 samples of semen plasma obtained from clinically healthy men of reproductive age. Planning and organization of validation activities were carried out in accordance with GOST ISO 15189-2015. The functional characteristics of the methods were determined in accordance with Order 45 of the Ministry of Health of the Russian Federation «On a system of measures to improve the quality of clinical laboratory research in healthcare facilities of the Russian Federation», and protocols of the CLSI Institute of Clinical Laboratory Standards (USA). It was possible to establish acceptable levels of linearity, precision and specificity for 31 of the 33 analytes studied. Also, the necessary dilution for 12 analytes was established empirically. Establishing the analytical reliability of biochemical methods for studying semen plasma opens up new possibilities for studying the metabolic characteristics of this biological fluid, and therefore expands the range of possibilities for its use as an object of laboratory research.

Key words: validation, analytical quality, semen plasma.

Введение

В настоящее время в лабораторной диагностике объектом биохимических исследований чаще всего является сыворотка или плазма крови, в некоторых случаях — моча и спинномозговая жидкость, экссудаты и транссудаты. Тем не менее появляются все новые данные о диагностической значимости некоторых биохимических параметров других альтернативных биологических жидкостей (спермоплазма [1, 6], миелоплазма [2], мокрота [4, 5], ротовая жидкость [7, 8]). Однако имеются определенные ограничения широкого применения биохимических исследований альтернативных био-

жидкостей в лабораторной практике ввиду неразработанности стандартизированного преаналитического этапа и отсутствия валидации данных методик. Основная цель валидирующих мероприятий — удостовериться, что новый прибор, метод или реагент подходят для достижения итоговой цели и удовлетворяют требованиям для их предполагаемого использования [3].

Цель исследования: валидация рутинных биохимических методов исследования альтернативных жидкостей на автоматическом биохимическом анализаторе на примере спермоплазмы.

Материалы и методы

Исследования проводились на автоматическом биохимическом анализаторе cobas Integra 400 plus (Roche, Швейцария) с применением оригинальных реактивов Roche (Швейцария). Материалами для исследования являлись 30 образцов спермальной плазмы, полученной от клинически здоровых мужчин репродуктивного возраста с лабораторно подтвержденным отсутствием острых и хронических воспалительных процессов в урогенитальном тракте, а также заболеваний, передающихся половым путем. При планировании и организации валидирующих мероприятий руководствовались ГОСТ

Таблица 1
Валидирующие мероприятия для тестирования спермальной плазмы

Тест	Диапазон измерения	CV _{вс} , %	CV, %	Sigma	Пропорц. ошибка, %	В, % 1-й уровень	В, % 2-й уровень
	CLSI EP6-A	Приказ № 45 Минздрава России	CLSI EP-5A2		ГОСТ Р 51352-2013	CLSI EP-15A3	
	Образцы пациентов (спермоплазма)					Референсный материал (ФСВОК/ EQAS) (на основе сыворотки)	
Общий белок, г/л	8,00–58,10	0,80	2,09	4,77	3,0	0,40	–0,70
Альбумин, г/л	1,50–11,30	0,80	2,34	4,53	2,0	0,86	2,33
АЛАТ, Е/л	2,90–178,30	1,80	3,93	10,11	7,7	0,35	5,55
АСАТ, Е/л	45,00–580,40	0,40	4,09	6,47	9,3	–11,70	2,60
ГГТ, Е/л	107,50–1189,90	1,80	2,28	13,82	6,6	14,00	16,60
КФК, Е/л	21,00–2015,40	1,00	4,03	13,17	5,9	–1,90	2,30
СРБ HS, мг/л	0,27–0,98	3,00	4,65	12,18	9,9	–13,30	–15,30
α1-антитрипсин, г/л	–	4,00	3,06	4,22	Не оценивалась	Не оценивалась	Не оценивалась
Мочевина, ммоль/л	2,30–20,50	1,00	2,15	12,33	2,30	6,30	4,70
Креатинин, мкмоль/л	218,00–1290,00	1,60	3,40	6,36	7,20	–7,00	–12,80
Мочевая кислота, мкмоль/л	91,90–1194,00	4,00	3,49	6,18	3,90	12,10	16,30
Триглицериды, ммоль/л	0,11–1,11	1,50	8,54	4,66	5,00	–4,80	–3,30
Холестерин, ммоль/л	0,08–2,90	0,70	4,00	4,91	1,90	–2,30	–0,60
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	0,08–0,69	0,70	3,56	4,00	2,80	–1,88	–3,16
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	0,07–2,30	1,50	3,51	5,11	5,60	1,78	7,56
Липаза, Е/л	13,30–74,90	1,80	2,56	15,26	8,70	0,86	3,58
Глюкоза, ммоль/л	0,24–8,51	1,50	3,95	3,35	4,00	3,80	5,10
Лактат, ммоль/л	1,59–14,42	0,60	1,85	24,14	2,00	4,55	6,27
Фруктозамин, мкмоль/л	40,10–424,70	0,70	1,83	3,20	6,70	–	–
АДГ реакция лактат–пируват, Е/л	15,10–1004,00	1,20	1,54	17,17	5,50	–	–
АДГ реакция пируват–лактат, Е/л	26,90–1213,00	1,60	1,55	17,14	5,00	–4,20	–1,80
ГБДГ, Е/л	15,70–701,80	4,70	3,19	4,98	7,20	–	–
Амилаза, Е/л	2,94–1613,30	2,00	2,56	12,29	3,40	–0,60	–6,90
Калий, ммоль/л	0,51–30,33	0,60	2,78	3,81	0,00	7,60	6,00
Натрий, ммоль/л	80,70–183,50	0,50	1,46	3,28	0,00	0,30	–2,70
Хлориды, ммоль/л	14,70–133,30	0,70	2,53	3,14	0,00	2,40	–1,30
Кальций, ммоль/л	0,80–5,02	0,40	2,23	3,56	1,20	–1,00	0,90
Фосфор, ммоль/л	0,61–6,66	1,00	2,5	7,31	2,60	–3,60	–5,60
Магний, ммоль/л	0,52–11,30	0,80	4,52	3,52	4,00	0,90	0,10
Железо, мкмоль/л	0,58–15,13	1,30	1,43	18,50	6,10	1,70	–1,50
Ферритин, мкг/л	102,00–512,00	1,50	3,40	6,36	5,20	3,00	17,10
Трансферрин, г/л	–	4,10	1,52	2,50	Не оценивалась	4,60	0,70
ЩФ, Е/л	25,90–1197,00	0,60	5,15	6,12	7,80	7,60	12,10

Р ISO 15189–2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности». Функциональные характеристики методик определялись в соответствии с приказом Минздрава России от 07 февраля 2000 года № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения

Российской Федерации», протоколами Института клинических лабораторных стандартов CLSI (США).

Результаты и обсуждения

Согласно нормативным документам требовалось валидировать:

- линейность (рабочий диапазон) — протокол CLSI EP6-A (Evaluation of the Linearity of

Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline);

- прецизионность — протокол CLSI EP5-A2 (Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline — Second edition);
- правильность — протокол CLSI EP9-A2 (Method Comparison and

Таблица 2
Схема приготовления образцов для определения диапазона измерения

Пулы	V первого образца, мкл	V второго образца, мкл	Коэффициент для расчета концентрации в пуле
1	100	0	1,00
2	75	25	0,25
3	50	50	0,50
4	25	75	0,75
5	100	0	1,00

Таблица 3
Определение рабочего диапазона валидируемых тестов

	Диапазон производителя (сыворотка крови)	Валидированный диапазон (спермоплазма)	Разведение образцов (деионизированная вода)
ГТТ, Е/л	0,00–1200,00	107,50–1189,90	1 : 10–1 : 20
КФК, Е/л	0,00–2000,00	21,00–2015,40	1 : 10
Креатинин, мкмоль/л	18,00–1300,00	218,00–1290,00	1 : 10
ЛДГ реакция лактат — пируват, Е/л	10,00–1000,00	15,10–1004,00	1 : 10
ЛДГ реакция пируват — лактат, Е/л	27,00–1200,00	26,90–1213,00	1 : 10
ГБДГ, Е/л	6,00–700,00	15,70–701,80	1 : 10
Калий, ммоль/л	0,20–30,00	0,51–30,330	1 : 10
Кальций, ммоль/л	0,20–5,00	0,80–5,02	1 : 2
Фосфор, ммоль/л	0,10–6,46	0,61–6,66	1 : 10
Магний, ммоль/л	0,56–11,00	0,52–11,300	1 : 10
Ферритин, мкг/л	10,00–484,00	102,00–512,00	1 : 2
ЩФ, Е/л	3,00–1200,00	25,90–1197,00	1 : 10–1 : 20

Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline — Second edition);

- аналитическую специфичность — ГОСТ Р 51352–2013. Медицинские изделия для диагностики инвитро. Методы испытаний.

Результаты валидации биохимических методик для спермальной плазмы представлены в табл. 1.

Определение линейного и рабочего диапазона измерения проводили в соответствии с протоколом CLSI EP6-A. Протокол эксперимента основан на полиномиальной регрессии. Полиномиальный подход является параметрическим. Предполагается, что полученные в эксперименте данные могут быть описаны математическим уравнением прямой линии или кривой, а случайная ошибка подчиняется законам нормального распределения. Для проведения эксперимента необходимы два пула образцов пациентов: (первый — с минималь-

ным содержанием исследуемого аналита, приблизительно равным минимальной концентрации детекции метода; второй — с содержанием аналита, максимально приближенным к верхнему пределу диапазона линейности метода, указанной производителем тест-системы. Приготавливали пять пулов образцов путем разведения второго образца первым согласно табл. 2.

Далее проводили дублированные исследования концентрации аналита в пяти пулах исследуемого материала и рассчитывали показатели статистики полиномиальной регрессии — коэффициенты полиномов первого (b_1), второго (b_2) и третьего (b_3) порядков:

- b_1 (прямая линия): $Y = a + b_1X$;
- b_2 : $Y = a + b_1X + b_2X^2$;
- b_3 : $Y = a + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$;
- стандартная ошибка регрессии.

С помощью моделей полинома оценивали, является ли зависимость линейной или нет. Если величины

коэффициентов нелинейности полинома второго и третьего порядков равны нулю, то ответ аналитической системы считался статистически линейным на протяжении всего диапазона измерения. Определение стандартной ошибки регрессии необходимо для оценки лучшей нелинейной аппроксимации полиномиальными моделями полученных экспериментальных данных.

Клиническая оценка степени нелинейности заключалась в сравнении величины различий между спрогнозированными результатами линейного и лучшего нелинейного полинома и половины величины допустимой общей ошибки определения аналита (TEa). Если эти различия для каждого результата были больше величины $1/2$ TEa, то в данной точке диапазон измерения метода считался клинически нелинейным, то есть неприемлемым. Соответственно, если эти различия для каждого результата были меньше величины $1/2$ TEa, то тогда в данной точке диапазон измерения метода считался клинически линейным, то есть приемлемым. Содержание некоторых исследуемых нами показателей метаболизма в спермоплазме превышало аналогичные в плазме крови, поэтому эмпирическим путем была установлена степень разведения образцов для данных аналитов (табл. 3). Для наших исследований спермальной плазмы неприемлемыми оказались методы определения α -1-антитрипсина и трансферрина.

Определение внутрисерийной невоспроизводимости метода установленным нормам точности осуществляли по методике, описанной в приказе Минздрава России № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». С этой целью проводили 10 измерений исследуемого аналита в одном и том же образце в одной аналитической серии. Далее рассчитывали коэффициент внутрисерийной вариации методики (CV_{BC}) и проверяли, выполняется ли неравенство $CV_{BC} \leq 0,5CV_{10}$ (значения CV_{10} определяли в соответствии

с приложением № 3 приказа или ГОСТ Р 51333.1–2008, если соответствующее значение отсутствовало. В нашем исследовании все протестированные методики, кроме α -1-антитрипсина и трансферрина продемонстрировали приемлемые уровни сходимости.

Оценка воспроизводимости была выполнена в соответствии с протоколом CLSI EP-5A2 и заключалась в сигмаметрической оценке полученных величин прецизионности со стандартами качества приказа Минздрава России № 220 от 26.05.2003 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Аналитическая эффективность системы для теста считалась неприемлемой, если ее сигмаметрическая оценка составляла 3 и менее. Сигматрию рассчитывали по формуле $\text{Sigma} = \text{TEa}_{\%}/\text{CV}_{\%}$. Неприемлемый уровень находился в диапазоне $< 2 \text{ Sigma}$; плохой уровень — $2\text{--}3 \text{ Sigma}$; пограничный — $3\text{--}4 \text{ Sigma}$; хороший — $4\text{--}5 \text{ Sigma}$; превосходный уровень — $5\text{--}6 \text{ Sigma}$; мировой уровень — $> 6 \text{ Sigma}$.

Для стандартов качества Минздрава России № 220 все аналитические системы и реагенты продемонстрировали приемлемую аналитическую эффективность для всех оцениваемых тестов.

Валидация правильности аналитических методов и систем согласно протоколу CLSI EP 9-A2 должна проводиться с участием референсной лаборатории, что в условиях нашего исследования невозможно, поэтому за основу был принят протокол CLSI EP 15-A3, допускающий использование референсных материалов программ внешней оценки качества FSCOK/EQAS, где величина целевого значения аналита оценивалась на основании результатов, полученной от группового сравнения. Задачей данного этапа исследования было получение объективных доказательств отсутствия статистически достоверного

аналитического смещения (В,%) между целевым значением референсного материала и его средним значением, полученным в нашей лаборатории. Для этого готовили по пять алиquot из каждого двухуровневого референсного материала и замораживали. В каждую из последующих пяти аналитических серий выполняли по пять измерений каждого уровня референсного материала, рассчитывали смещение В, % и сравнивали полученное значение с предельно допустимым.

Таким образом, валидация правильности аналитических методов и систем установила, что величина смещения для всех тестов по двум контрольным уровням находится в допустимых пределах.

Определение аналитической специфичности проводили согласно ГОСТ Р 51352–2013. Для определения величины пропорциональной систематической ошибки метода, возникающей в результате эффекта матрицы биоматериала, проводили эксперимент на открытие: готовили две серии проб с исследуемым аналитом: базовая содержала аналит в сочетании с раствором аналита с известной концентрацией; контрольная — аналит и дилуент. Определяли концентрацию аналита в двух сериях проб, затем величину открытия и константной систематической ошибки. Процент открытия рассчитывался как отношение рассчитанной и полученной разницы концентраций аналитов базовой и контрольной проб, выраженное в процентах, и величина пропорциональной ошибки как разница между 100%-ным идеальным открытием и полученной величиной открытия.

Процент открытия для всех аналитов составлял 90–100, что соответствует требованиям ГОСТа (данные не представлены).

Выводы

При проведении валидаций биохимических методик исследования спермальной плазмы для автоматического биохимического анализатора cobas Integra 400 plus удалось установить

приемлемые уровни линейности, прецизионности, правильности и специфичности для 31 из 33 исследуемых аналитов. Неприемлемые результаты были выявлены только для трансферрина и α -1-антитрипсина. Также эмпирическим путем была установлена степень необходимого разведения для 12 показателей. Установление аналитической надежности биохимических методик исследования спермоплазмы открывает новые возможности для изучения метаболических характеристик данной биологической жидкости, а значит, и расширяет спектр возможностей ее использования в качестве объекта лабораторных исследований.

Список литературы

1. Антонов М. П., Жигулина В. В. Влияние биохимических изменений липидов сперматозоидов и спермоплазмы на фертильность эякулята // Верхневолжский медицинский журнал. — 2012. — Т. 10, № 3. — С. 47–51.
2. Габрильчак А. И., Федорова О. И., Сосновская Л. В. Биохимический и иммунологический состав миелоплазмы у пациентов с иммунной тромбоцитопенией // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета. Челябинск, 2019. С. 27–30.
3. Джузеппе Л., Майкл П. К., Кьелл Г., Мадс Н., Ана-Мария С. Мнение экспертов Рабочей группы по преаналитическому этапу EFLM: локальная валидация пробирок для забора крови в клинических лабораториях // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2018. — Т. 7, № 1. — С. 41–50.
4. Козлов А. В., Гусякова О. А., Ерещенко А. А., Халиулин А. В. Диагностические возможности современного биохимического исследования мокроты у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. — 2019. — Т. 64, № 1. — С. 24–28.
5. Козлов А. В., Гусякова О. А., Лямин А. В., Ерещенко А. А., Арчибасова О. В., Иванова Н. В., Жестков А. В., Сергиенко Д. Ф. Метаболизм железа как патогенетическое звено развития инфекционных осложнений при муковисцидозе // Астраханский медицинский журнал. — 2019. — Т. 14, № 2. — С. 25–33.
6. Николаев А. А., Луцкий Д. Л., Ложкина Л. В. Белковый спектр эякулятов различной фертильности // Урология и нефрология. — 1998. — № 2. — С. 48–52.
7. Селезнева И. А., Свечникова М. В., Гильмиев Э. М., Гусякова О. А., Гильмиева Ф. Н., Кузнецова О. Ю. Молекулярные маркеры повреждения слизистой оболочки полости рта у пациентов с лейкозами // Клиническая лабораторная диагностика. — 2018. — Т. 63, № 6. — С. 349–352.
8. Фотина И. А. Информативность изменений биохимических параметров ротовой жидкости и сыворотки крови при сахарном диабете 2 типа // Вестник новых медицинских технологий. — 2011. — Т. 18, № 4. — С. 184–185.