

применения которого у пораженных животных показатели антиоксидантной системы приближены к уровню животных интактного контроля.

*Ключевые слова:* карбофос, тетрахлорметан, мексидол, антиоксидантная система, восстановленный глутатион, каталаза, церулоплазмин

L.A. Boyko, L. S. Fira, P.G. Lyhatskiy

I. Ya Horbachevsky Ternopil state medical university

#### DYNAMIC OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AFTER THE APPLYING OF MEXYDOL AT THE CONDITION OF THE COMBINED AFFECTING WITH TETRACHLOROMETHANE AND CARBOPHOS

It was established the strong disorders in the antioxidant system, that characterized by the decreasing of the reducing glutathione's quantity and the changing in the activity of catalase in the animal's liver and myocard, in the amount of ceruloplasmin in the blood serum during the experiments on the rats at the condition of the combined affecting with tetrachloromethane and carbophos. It was confirmed the effectiveness of mexydol at this pathology. After its applying the indicators of the antioxidant system in the affecting animals approached to the level of the antioxidant system in the intact animals.

**Keywords:** carbophos, tetrachloromethane, mexydol, antioxidant system, reducing glutathione, catalase, ceruloplasmin

Рекомендує до друку

Надійшла 03.09.2014

О.Б. Столяр

УДК 57.083.3 + 616-71 + 543.9

<sup>1</sup>О.Ю. ГАЛКІН, <sup>1</sup>О.Б. БЕСАРАБ, <sup>2</sup>Ю.В. ГОРШУНОВ, <sup>1</sup>О.М. ДУГАН

<sup>1</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»  
пр-т. Перемоги, 37, Київ, 03056

<sup>2</sup>Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства  
вул. Урицького, 35, Київ, 03035

### **БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО НАБОРУ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ Е ЛЮДИНИ**

У статті наведено науково-методичне обґрунтування процедури біоаналітичної валідації імуноферментного набору для кількісного визначення загального IgE людини. Валідаційні характеристики (прецизійність, діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, правильність, лінійність) визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (як елемент дослідження стабільності). Середнє значення діагностичної специфічності склало 99,3%. Методика імуноферментного аналізу забезпечила лінійний характер залежності у діапазоні 10-1000 МО/мл, а невизначеність калібрувального графіку була незначущою. Межа виявлення становила 1,42 МО/мл, а межа кількісного визначення (аналітична чутливість) – 4,33 МО/мл. Межа відтворюваності співпадала із аналітичною чутливістю набору. Правильність, виражена через систематичну похибку, склала 0,25 МО/мл та була статистично незначущою.

*Ключові слова:* імуноферментний аналіз, валідація, IgE людини

Оцінка придатності аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей. Державна фармакопея України (ДФУ) визначає валідацію аналітичних методик як процедуру

експериментального доведення того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань [2]. Слід зазначити, що засоби для серологічної *in vitro* діагностики (які в Україні та Європейському Союзі відносяться до класу медичних виробів [4]) мають низку особливостей та відмінностей від лікарських засобів, через що підходи до їх біоаналітичної стандартизації мають відрізнятися від аналогічних підходів, що застосовують у випадку лікарських засобів. У наших попередніх дослідженнях проведено аналіз вимог національних та міжнародних нормативних документів щодо якості та безпечності медичних виробів для діагностики *in vitro* та обговорено можливість часткового застосування рекомендацій ДФУ до даного виду продукції [6]. Нами було визначено, що параметрами біоаналітичної стандартизації та валідаційними характеристиками для якісних (напівкількісних) засобів для серологічної діагностики можуть бути прецизійність (збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність та відтворюваність), діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, а для кількісних – додатково правильність (точність), лінійність, аналітична чутливість та діапазон застосування. З огляду на відсутність національних рекомендацій щодо проведення валідації біоаналітичних методик, що використовуються у серологічній *in vitro* діагностиці, ми вважаємо вкрай актуальним питання створення науково-методичних рекомендацій щодо валідації імуноферментних наборів для якісного та кількісного визначення біоаналітів (у т. ч. із залученням досвіду провідних світових фахівців) [6, 10].

Метою роботи було обґрунтування процедури та проведення валідації імуноферментного аналізу (ІФА), що призначений для кількісного визначення загального IgE людини у сироватці або крові.

### Матеріал і методи досліджень

*Діагностичні набори.* Використовували три дослідні серії набору у різні дні, різними виконавцями-операторами: відразу після виготовлення наборів та через один рік – наприкінці строку придатності (як елемент дослідження стабільності набору).

*Стандартні зразки.* Для проведення валідації використовували міжнародний стандарт IgE людини із концентрацією 5000 МО/мл (The 2<sup>nd</sup> WHO International Reference Preparation of Human Serum Immunoglobulin E) [11], із якого готували контрольні зразки IgE із концентрацією 0, 10, 50, 250, 500 та 1000 МО/мл та використовували для побудови калібрувального графіку.

*«Сендвіч»-варіант ІФА.* Моноклональні антитіла (МКАТ) специфічні до IgE людини [11], сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові планшети для твердофазного ІФА. Планшет інкубували протягом 12 год при 4 °С, потім тричі відмивали фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2-7,4 та витримували у розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл в ФСБ) 1 год при 37 °С. Після чотирьохкратної відмивки ФСБТ лунки планшету заповнювали 100 мкл реакційного буферу (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2 % Tween-20, 25 мкг/мл мишиних МКАТ, неспецифічних до IgE людини), що містить 200 нг/мл мічених пероксидазою хрому МКАТ до IgE людини. Далі у лунки вносили по 20 мкл контрольних стандартизованих зразків IgE із концентраціями 0, 10, 50, 250, 500 та 1000 МО/мл та досліджуваних зразків сироваток крові людини попередньо розведених реакційним буфером 1:1000. Планшети інкубувалися 2 год за температури 37 °С при постійному вструшуванні та відмивалися 4 рази. Подальшу процедуру проводили як і для непрямого ІФА. Концентрація IgE людини розраховувалась за допомогою калібрувального графіка стандартних (контрольних) зразків.

*Математичні (статистичні) методи.* Регресійний аналіз проводили за відповідними рекомендаціями [2, 3, 5] та із використанням програмних комплексів MathCAD та Microsoft Excel.

Діагностичну специфічність (ДС) розраховували за формулою (1):

$$ДС = |C_{0+добавка} - C_0| / C_{добавка} \times 100\%$$

де  $C_0$  – концентрація аналіту у досліджуваному зразку, визначена за допомогою даного методу;  $C_{добавка}$  – концентрація аналіту у стандартному зразку;  $C_{0+добавка}$  – концентрація аналіту в

об'єднаній пробі досліджуваного та стандартного зразку, визначена за допомогою даного методу.

Стандартне відхилення для нульової концентрації  $S_x$  розраховували за формулою (2)

$$S_x = \frac{S_0}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 \times \left(\frac{Y_0 - Y_{\text{сер}}}{S_0}\right)^2}, \quad (2)$$

де  $m$  – кількість точок калібрувального графіку;  $n$  – кількість повторів визначення;  $b$  – коефіцієнт нахилу лінії регресії;  $S_0^2$  – дисперсія різниці між дослідними та розрахованими за рівнянням лінійної регресії значеннями;  $S_b$  – дисперсія коефіцієнта  $b$ ;  $Y_0$  – значення залежної змінної при  $x = 0$ ;  $Y_{\text{сер}}$  – середнє арифметичне значень змінної  $y$  із урахуванням  $Y_0$ .

Межу проміжної прецизійності  $R$  розраховували за формулою (3)

$$R = t \sqrt{2 \times S_R^2}, \quad (3),$$

де  $S_R$  – стандартне відхилення в умовах відтворюваності, виражене через середнєзважену дисперсію для кожного діапазону концентрацій ( $S_R = \sqrt{S_{\text{сер}}^2}$ );  $t$  – критичне значення критерію Стьюдента при довірчій вірогідності 0,95 та певній кількості ступенів свободи.

Систематичну похибку аналізу (зсув)  $\Theta$  визначали як різницю між середнім значенням результатів аналізу  $X_{\text{сер}}$  та значенням стандартного зразка (СЗ)  $X_{\text{см}}$ . Значимість отриманого значення  $\Theta$  перевіряли по розрахованому критерію Стьюдента (4)

$$t = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S^2}{L} + \frac{\Delta_{\text{см}}^2}{3}}}, \quad (4)$$

де  $S$  – дисперсія середніх значень для різних визначень відносно їх середнього значення;  $L$  – кількість визначень;  $\Delta_{\text{см}}$  – похибка СЗ.

### Результати досліджень та їх обговорення

Деякі характеристики набору, які відносяться до валідаційних (аналітична специфічність, діапазон застосування), вже було визначено під час розробки [6], тому в рамках даної роботи ми не зупинялися на встановленні цих характеристик.

*Оцінка діагностичної специфічності набору.* Як відомо ДС характеризує спроможність методу визначати лише той компонент, для якого він призначений, тобто, характеризує здатність відповідного засобу реєструвати мінімальну кількість хибнопозитивних результатів [7]. Визначення ДС імуноферментних наборів проводять із використанням широкого набору негативних зразків (стандартних, стандартизованих, або охарактеризованих), розраховуючи частку дійснопозитивних результатів дослідження за формулою (1). Такий підхід реалізується у випадку тест-систем, що призначені для якісного або напівкількісного визначення специфічних антитіл, тобто у випадку, коли абсолютна кількість аналізу зразку не відома та/або не може бути достовірно визначена доступними методами. Даний підхід не може бути реалізований у випадку оцінки прийнятності кількісного аналізу, тим більше коли мова йде про визначення неінфекційного аналіту, для якого існують міжнародні стандарти. Пропонуємо у даній ситуації для оцінки діагностичної специфічності використовувати так званий метод добавок, який дозволяє виразити специфічність через долю виявлення цільового аналіту у зразках із заздалегідь відомої концентрацію останнього. Результати визначення діагностичної специфічності набору наведені у табл. 1. Для всіх визначень середнє значення ДС склало 99,3%, причому для визначень №1-3 СД (100,9%) була дещо вищою, аніж для визначень №4-6 (97,8%), які проводили через рік, наприкінці терміну придатності. Таким чином, на момент випуску середній рівень визначення аналізу дещо вищий, у порівнянні із аналогічним показником на момент терміну придатності набору. Такі результати пояснюються певним спаданням біологічної активності біореагентів набору. Разом із тим, всі отримані результати щодо ступеню визначення IgE людини у досліджуваних зразках для кожного визначення

знаходяться у межах від 95,8% до 104,4%, що відповідає загальноприйнятим допустимим межам (не менше 95%). Отже діагностична специфічність набору є задовільною (як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності).

*Оцінка лінійності набору.* Для оцінки даного показника нами був проведений регресійний аналіз залежності оптичної густини (ОГ) при 450 нм від концентрації IgE людини у діапазоні визначення (10-1000 МО/мл): використовували калібратори набору (10, 50, 250, 500, 1000 МО/мл), а також зразок сироватки із концентрацією IgE людини 10,5 МО/мл (табл. 1: серія №0313, визначення №1) із відповідними добавками (чотири зразка: 10,5, 20,5, 110,5 та 1010,5 МО/мл). Для обох рядів даних розраховували коефіцієнти кореляції та детермінації. Дані коефіцієнти не перевищували 0,995, що відповідає критеріям прийнятності. Для двох даних визначень (рядів даних) була проведена оцінка їх паралелізму. Відповідні результати представлено на рис.1: коефіцієнти нахилу рівнянь лінійної регресії різняться на незначну величину ( $4,3 \times 10^{-5}$ ), що свідчить про паралельність залежності ОГ від концентрації аналіту для стандартних зразків та досліджуваного матеріалу. Зважаючи на те, що імуноферментний набір забезпечує кількісне визначення аналіту та містить низку калібраторів, які використовуються для побудови калібрувального графіку, доцільно було дослідити невизначеність положення даного графіку. Результати відповідних розрахунків (табл.2) свідчать про те, що невизначеність калібрувального графіку, виражена за допомогою довірчої області лінії регресії при довірчій вірогідності 0,95 є незначною та може не враховуватися при проведенні розрахунків. Дані висновки стосуються як визначень на момент випуску, так і визначень на термін придатності, що є підтвердженням задовільного рівня стабільності набору.

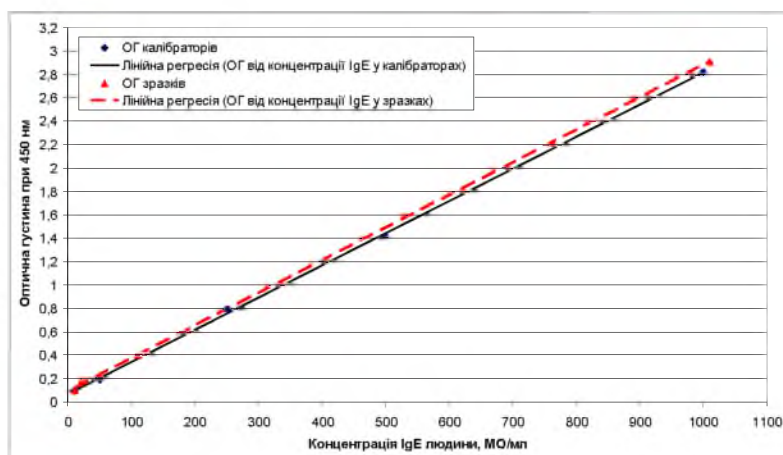


Рис. 1. Залежність оптичної густини від вмісту IgE людини у калібраторах та зразках (лінійна регресія для калібраторів:  $y = 0,002746x + 0,069202$ ; лінійна регресія для зразків:  $y = 0,002789x + 0,091701$ )

Таблиця 1

Результати визначення діагностичної специфічності імуноферментного аналізу

Характеристика зразка (№ серії, теоретична концентрація аналіта)	Визначення на момент випуску серії						Визначення на момент строку придатності серії					
	№1		№2		№3		№4		№5		№6	
	Вміст, МО/мл	Виявлення, %	Вміст, МО/мл	Виявлення, %	Вміст, МО/мл	Виявлення, %	Вміст, МО/мл	Виявлення, %	Вміст, МО/мл	Виявлення, %	Вміст, МО/мл	Виявлення, %
Серія 0113												
Без добавки	24,0	–	24,2	–	24,4	–	23,6	–	23,8	–	23,5	–
Добавка 10 МО/мл	33,7	97,0	34,4	102,0	34,7	103,0	33,2	96,0	32,9	91,0	33,1	96,0
Добавка 100 МО/мл	125,0	101,0	125,2	101,0	126,1	101,7	124,0	100,4	122,7	99,0	122,5	99,0
Добавка 1000 МО/мл	1025,7	100,2	1023,0	99,9	1026,2	100,2	1022,2	99,9	1021,9	99,8	1023,0	100,0
Серія 0213												

## БІОХІМІЯ

Продовження таблиці 1												
Без добавки	37,5	–	37,2	–	37,6	–	37,0	–	37,1	–	37,0	–
Добавка 10 МО/мл	48,4	109,0	48,1	109,0	48,8	112,0	47,1	101,0	46,2	91,0	47,9	109,0
Добавка 100 МО/мл	138,0	100,5	138,2	101,0	139,0	101,4	135,0	98,0	135,2	98,1	134,0	97,0
Добавка 1000 МО/мл	1035,5	99,8	1036,0	99,9	1036,6	99,9	1034,2	99,7	1033,3	99,6	1038,2	100,1
Серія 0313												
Без добавки	10,5	–	10,3	–	10,5	–	10,2	–	10,2	–	10,3	–
Добавка 10 МО/мл	20,0	95,0	20,1	98,0	19,7	92,0	19,1	89,0	19,0	88,0	19,8	95,0
Добавка 100 МО/мл	110,0	99,5	111,1	100,8	109,5	99,0	108,7	98,5	107,8	97,6	109,1	98,8
Добавка 1000 МО/мл	1012,0	100,2	1012,5	100,2	1011,1	100,1	1010,0	100,0	1009,1	99,9	1009,0	99,9

Таблиця 2

### Довірча область лінії регресії при визначенні лінійності аналізу

№ визначення	Концентрація $x$ , МО/мл	Рівняння лінійної регресії	Значення $\bar{y}$ (ОГ) рівняння лінійної регресії у точці $x$	Довірча область лінії регресії при $x$ МО/мл
1	10	$y = 0,002789x + 0,091701$	0,1196	$0,1029 < y < 0,1391$
	50		0,2312	$0,2017 < y < 0,2988$
	250		0,7890	$0,6987 < y < 0,8125$
	500		1,4863	$1,2021 < y < 1,6580$
2	10	$y = 0,002741x + 0,073254$	0,1007	$0,1001 < y < 0,1295$
	50		0,2103	$0,2099 < y < 0,2583$
	250		0,7585	$0,7445 < y < 0,7824$
	500		1,4438	$1,3224 < y < 1,5333$
3	10	$y = 0,003102x + 0,05966$	0,0907	$0,8227 < y < 0,0910$
	50		0,2148	$0,1855 < y < 0,2152$
	250		0,8352	$0,7514 < y < 0,8774$
	500		1,6107	$1,4155 < y < 1,6651$
4	10	$y = 0,003307x + 0,04291$	0,0760	$0,0622 < y < 0,0891$
	50		0,2083	$0,1998 < y < 0,3220$
	250		0,8697	$0,8660 < y < 1,0011$
	500		1,6964	$1,4889 < y < 1,6984$
5	10	$y = 0,003118x + 0,04461$	0,0758	$0,0635 < y < 0,0901$
	50		0,2005	$0,1852 < y < 0,2824$
	250		0,8241	$0,8521 < y < 1,0253$
	500		1,6036	$1,4952 < y < 1,7002$
6	10	$y = 0,002897x + 0,08022$	0,1092	$0,1015 < y < 0,1320$
	50		0,2251	$0,2125 < y < 0,2622$
	250		0,8045	$0,7211 < y < 0,8025$
	500		1,5287	$1,3115 < y < 1,5441$

*Розрахунок межі виявлення та межі кількісного визначення (аналітичної чутливості) набору. Розрахунок даних показників проводили через попереднє визначення стандартного відхилення для нульової концентрації  $S_x$  за формулою (2). Відповідно до міжнародних рекомендацій [9] межа виявлення розраховується як  $S_x \times 3,3$ , а аналітична чутливість –  $S_x \times 10$ . Відповідні розрахунки проводили із використанням програмного комплексу MathCAD. Вихідними даними для розрахунків слугували калібрувальні графіки калібраторів набору серії 0313, визначення №№1-6. Результати розрахунків представлено у табл. 3: розрахункові значення межі виявлення та межі кількісного визначення знаходяться у діапазонах 0,77-1,42 МО/мл та 2,34-4,33 МО/мл, відповідно. У такому випадку для діагностичного набору прийнято встановлювати найвище значення розрахункової аналітичної чутливості (тобто 4,33 МО/мл). Зазначимо, що отримані дані цілком співвідносяться із результатами альтернативного*

## БІОХІМІЯ

визначення аналітичної чутливості набору, проведеного у роботі [7], коли даний показник склав 4,5 МО/мл.

Таблиця 3

Результати розрахунку меж виявлення та кількісного визначення

№ визначення	Стандартне відхилення для нульової концентрації ( $S_x$ )	Межа виявлення, МО/мл	Межа кількісного визначення (аналітична чутливість), МО/мл
1	0,430	1,42	4,30
2	0,234	0,77	2,34
3	0,320	1,06	3,20
4	0,401	1,32	4,01
5	0,394	1,30	3,94
6	0,433	1,42	4,33

*Визначення прецизійності набору.* Як відомо прецизійність може розглядатися на різних рівнях, зокрема: збіжність (постановки аналізу за тих самих умов протягом невеликого проміжку часу), внутрішньолaboratorна прецизійність (враховує внутрішньолaboratorні варіації), відтворюваність (при між laboratorному експерименті). Зважаючи на той факт, що діагностичний набір, що піддається валідації, призначений для кількісного визначення аналіту (IgE людини) у широкому діапазоні значень (від 0 до 1000 МО/мл), вважаємо за доцільне обрати для оцінки прецизійності методу так звану проміжну прецизійність (різновидність внутрішньолaboratorної прецизійності), яка характеризує ступінь близькості результатів для серії вимірів із використанням проб із різним вмістом аналіту.

Дослідження проводили із використанням трьох серій набору у трьох діапазонах концентрацій аналіту (0-10, 10-100, 100-1000 МО/мл): три визначення на момент випуску та ще три визначення на момент закінчення терміну придатності. Проміжну прецизійність оцінювали за стандартним відхиленням  $S_R$  та межею проміжної прецизійності (відтворюваності)  $R$ , які обраховували для кожного з діапазону концентрацій IgE людини (табл. 4-5) за формулою (3).

Таблиця 4

Розрахунок стандартного відхилення проміжної прецизійності та межі відтворюваності на момент випуску серій набору

Діапазон концентрацій, МО/мл	Серія набору	Вміст IgE людини, МО/мл			Дисперсія $S^2$	Середнє значення дисперсії $S_{сер}^2$	Стандартне відхилення $S_R$	Межа проміжної прецизійності $R$ , МО/мл
		Визначення						
		№1	№2	№3				
0-10	0113	5,2	5,2	5,3	0,0033	0,0056	0,0745	1,07
	0213	5,2	5,3	5,2	0,0033			
	0313	5,1	5,2	5,3	0,0100			
10-100	0113	24,0	24,2	24,4	0,0400	0,0422	0,2055	1,78
	0213	37,5	37,2	37,6	0,0433			
	0313	20,0	20,1	19,7	0,0433			
100-1000	0113	125,0	125,2	126,1	0,3433	0,4311	0,6566	3,19
	0213	138,0	138,2	139,0	0,2800			
	0313	110,0	111,1	109,5	0,6700			

Отримані результати свідчать, що межа відтворюваності для низьких концентрацій становить 0,37 МО/мл, для середніх – 1,06 МО/мл, для високих – 2,80 МО/мл. Стандартне відхилення та межа відтворюваності збільшуються як при збільшенні концентрації аналіту, так й із часом (на момент закінчення терміну придатності). Разом із тим, розраховані валідаційні характеристики у всіх діапазонах концентрацій не можуть бути використані для характеристики набору, оскільки встановлені межі виявлення та кількісного визначення (аналітичної чутливості) свідчать про те, що всі значення нижче 1,42 МО/мл статистично не відрізняються від нуля, а нижче 4,33 МО/мл – не можуть бути кількісно визначені. Таким

чином, у даному випадку де факто межа відтворюваності співпадає із аналітичною чутливістю набору.

Таблиця 5

Розрахунок стандартного відхилення проміжної прецизійності та межі відтворюваності на момент закінчення строку придатності наборів

Діапазон концентрацій, МО/мл	Серія набору	Вміст IgE людини, МО/мл			Дисперсія $S^2$	Середнє значення дисперсії $S_{сер}^2$	Стандартне відхилення $S_R$	Межа проміжної прецизійності $R$ , МО/мл
		Визначення						
		№4	№5	№6				
0-10	0113	5,1	5,2	5,1	0,0033	0,0089	0,0943	1,21
	0213	5,2	5,3	5,1	0,0100			
	0313	5,1	5,1	5,3	0,0133			
10-100	0113	23,6	23,8	23,5	0,0233	0,0722	0,2687	2,04
	0213	37,0	37,1	37,0	0,0033			
	0313	19,1	19,0	19,8	0,1900			
100-1000	0113	124,0	122,7	122,5	0,6633	0,5067	0,7118	3,32
	0213	135,0	135,2	134,0	0,4133			
	0313	108,7	107,8	109,1	0,4433			

Таблиця 6

Оцінка систематичної похибки (зсуву) ІФА для визначення IgE людини

№ визначення	Вміст, розрахований за калібрувальним графіком, МО/мл	Середнє значення вмісту для визначення, МО/мл	Середнє значення вмісту для всіх визначень $X_{сер}$ , МО/мл	Дисперсія середніх значень вмісту $S^2$	Зсув $\theta$ , МО/мл	Похибка стандартного зразка $\Delta_{cm}$ , МО/мл [11]	Критерій Стюдента розрахунковий, $t$
1	50,2; 50,0; 50,8; 50,0	50,25	50,06	0,02	0,25	0,155	1,06
2	50,0; 50,3; 50,3; 50,1	50,18					
3	50,2; 50,1; 49,6; 49,9	49,95					
4	49,5; 50,4; 50,1; 50,1	50,03					
5	50,0; 50,3; 50,3; 50,1	50,05					
6	49,5; 50,1; 50,0; 50,0	49,90					

Визначення правильності (точності) набору. Як відомо правильність характеризує відхилення отриманого значення від номінального та обумовлено постійною та/або пропорційною систематичною похибкою. Найбільш простим способом визначення правильності у даному випадку вважаємо спосіб із застосуванням набору зразків для оцінювання у вигляді СЗ [3]. Даний спосіб передбачає розрахунок систематичної похибки (зсуву)  $\theta$  та перевірку останньої за критерієм Стюдента за формулою (4). Результати відповідних розрахунків за результатами дослідження набору серії 0113 наведено у табл. 6. Отже розрахунковий критерій Стюдента склав 1,06, що є нижчим за табличне значення даного критерію  $t_{табл} = 2,57$  для ступенів свободи  $f = n - 1 = 6 - 1 = 5$  та довірчій вірогідності 0,95. Такі результати свідчать про те, що систематична похибка (зсув) є незначущою. Важливо, що такі дані отримані при використанні результатів дослідження серії набору як на момент випуску, так і на момент терміну придатності, що додатково підтверджує задовільний рівень стабільності набору.

### Висновки

На прикладі імуноферментного набору для кількісного визначення загального IgE людини проведено науково-методичне обґрунтування процедури валідації засобу для серологічної *in vitro* діагностики. Валідаційні характеристики визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (для встановлення його стабільності).

Середнє значення діагностичної специфічності становить 99,3%. Методика ІФА є лінійною у діапазоні 10-1000 МО/мл, а невизначеність калібрувального графіку є незначущою. Межа виявлення становить 1,42 МО/мл, а межа кількісного визначення (аналітична чутливість) співпадає із межею відтворюваності та становить 4,33 МО/мл. Правильність (систематична похибка) складає 0,25 МО/мл та є статистично незначущою. Всі визначені характеристики ІФА є задовільними відповідно до вимог міжнародних нормативних документів.

1. Галкін О.Ю. Параметри біоаналітичної стандартизації засобів для серологічної діагностики / О.Ю. Галкін // Матер. IV Міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (16-17 жовтня 2014 р., м. Харків). — Х., 2014. — С. 74—75.
2. Державна фармакопея України. Перше видання. Доповнення 2 // Під ред. О.І. Гризодуба. — Х.: РІРЕГ, 2008. — 617 с.
3. РМГ 61—2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки [Текст]. — Взамен РМГ 61—2003; дата введения 2012—09—01. — М.: Стандартинформ, 2012. — 60 с.
4. Технічний регламент щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 21.10.2013 р. № 754 // Офіційний вісник України. — 2013. — № 82. — С. 3047.
5. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / Виктор Юльевич Урбах. — М.: Издательство АН СССР, 1963. — 321, [1] с.
6. Ederveen J.C. A practical approach to biological assay validation / J.C. Ederveen. — Hoofddorp: Progress, 2010. — 106 [1] p.
7. Galkin A.Yu. Elaboration of immunoenzymatic test-kit for total human IgE assay and investigation of its analytical properties / A. Yu. Galkin, A. M. Dugan // International Journal of Immunology. — 2013. — 1, № 1. — P. 1—6.
8. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases / O. Yu. Galkin // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2010. — 5, № 4 — С. 54—60.
9. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, ICH Q2B. — Geneva: 1996. — 11 p.
10. Parreno V. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards / V. Parreno, S.A. Romera, L. Makek // J. Virol. Meth. — 2010. — Vol. 169, 1. — P. 143-153.
11. W.H.O. Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series 1981; 658: 21.

*А.Ю. Галкин, А.Б. Бесараб, Ю.В. Горшунюв, А.Н. Дуган*

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»

Научно-исследовательский и конструкторско-технологический институт городского хозяйства

#### БІОАНАЛІТИЧЕСКАЯ ВАЛИДАЦИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО НАБОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ИМУНОГЛОБУЛИНА Е ЧЕЛОВЕКА

В статье проведено научно-методическое обоснование процедуры биоаналитической валидации иммуноферментного набора для количественного определения общего IgE человека. Валидационные характеристики (прецизионность, диагностическая и аналитическая специфичность, диагностическая чувствительность, правильность, линейность) определяли как на момент выпуска диагностического набора, так и на момент окончания срока годности (как элемент исследования стабильности). Среднее значение диагностической специфичности составило 99,3%. Методика иммуноферментного анализа была линейной в диапазоне 10-1000 МЕ/мл, а неопределенность калибровочного графика была незначимой. Предел обнаружения составил 1,42 МЕ/мл, а предел количественного определения (аналитическая чувствительность) — 4,33 МЕ/мл. Предел воспроизводимости совпал с аналитической чувствительностью набора. Правильность, выраженная через систематическую погрешность, составила 0,25 МЕ/мл и была статистически незначимой.

*Ключевые слова:* иммуноферментный анализ, валидация, IgE человека



O.Yu. Galkin, O.B. Besarab, Yu.V. Gorshunov, O.M. Dugan  
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"  
Scientific-Research and Design-Technological Institute of Municipal Economy

#### BIOANALYTICAL VALIDATION OF IMMUNOENZYMATIC TEST-KIT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL HUMAN IMMUNOGLOBULIN E

The scientific and methodical study of procedure of bioanalytical validation of ELISA kit for the quantitative determination of total human IgE has presented. Validation characteristics (precision, diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, accuracy, linearity) were determined as at the release of diagnostic kits, and at the time of expiry (as part of the stability studies). Mean diagnostic specificity was 99.3%. Immunoenzymatic method was linear in the range 10-1000 IU/mL, and the uncertainty of the calibration graph was insignificant. The detection limit was 1.42 IU/mL, and the limit of quantification of (analytical sensitivity) was 4.33 IU/mL. Reproducibility limit coincides with the analytical sensitivity. Accuracy is expressed in terms of systematic error, was 0.25 IU/mL, and was statistically insignificant.

Keywords: ELISA, validation, human IgE

Рекомендує до друку  
О.Б. Столяр

Надійшла 02.09.2014

УДК: 612.017.1/015.1-02:616.36-002-099]-092.9

А.Є. МУДРА

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»  
майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001

#### **NO-СИНТАЗА ТА ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКІНИ ПРИ ГОСТРОМУ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ ТА ЗА ВПЛИВУ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ**

Вивчали зміни вмісту прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ , ендотеліальної та індукційної молекулярних форм NO-синтази (eNOS, iNOS відповідно) та продуктів метаболізму оксиду азоту, нітрит і нітрат аніонів при експериментальному гепатиті та на фоні застосування модуляторів його синтезу. Встановлено, що при гострому токсичному ураженні печінки спостерігається зниження вмісту стабільних метаболітів NO у печінці та наростання їх концентрації в крові, зменшення рівня eNOS з вираженим наростанням кількості iNOS та концентрації прозапальних цитокінів. Прекурсори оксиду азоту сприяють активації синтезу NO, зниженню вмісту прозапальних цитокінів та експресії iNOS, при цьому спостерігається зростання вмісту eNOS. Повне інгібування ферментативного синтезу оксиду азоту шляхом застосування неселективного блокатора NOS L-NAME за гострого токсичного гепатиту призводить до зниження рівня NO<sub>2</sub>- та NO<sub>3</sub>, концентрації eNOS та iNOS на фоні високого рівня IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ . Блокування iNOS-індукованого синтезу NO призводить до зміни вмісту нітрит і нітрат аніонів та зниження активності індукційної NO-синтази як у крові, так і у печінці.

*Ключові слова:* прозапальні цитокіни, ендотеліальна NO-синтаза, індукційна NO-синтаза, оксид азоту, печінка

З'ясування сигнальної ролі та шляхів утворення монооксиду азоту (NO) у організмі створило нові можливості пошуку шляхів корекції патологічних станів [1,2]. В організмі людини і тварин NO утворюється в результаті окислення гуанідинових групи L-аргініна, яке каталізується групою ферментів - синтаз оксиду азоту. Одна з форм синтази оксиду азоту