

УДК 57.083.3 + 616-71 + 543.9

БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ЯКІСНОГО (НАПІВКІЛЬКІСНОГО) ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IGA ДО *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Галкін О.Ю.¹, Горшунів Ю.В.², Бесараб О.Б.¹

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ,
Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства,
Київ, Україна
E-mail: alexfbt@mail.ru

Метою даного дослідження було науково-методичне обґрунтування процедури валідації засобу для серологічної *in vitro* діагностики на прикладі імуноферментного набору для якісного (напівкількісного) визначення специфічних антитіл класу IgA до *Chlamydia trachomatis*. Валідаційні характеристики (прецизійність, діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, відносна лінійність) визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (як елемент дослідження стабільності). Показники діагностичної чутливості та специфічності, встановлені за допомогою внутрішньовиробничої панелі сироваток (20 позитивних та 50 негативних) склали 100%. Присутність у досліджуваних зразках антитіл інших класів до збудника уrogenітального хламідіозу не впливала на коректність аналізу щодо визначення специфічних антитіл класу IgA. Лінійність методики була задовільною. Збіжність результатів аналізу знаходилася у межах від 3,4% до 6,8%, а внутрішньолабораторна прецизійність – від 4,0% до 7,3%, залишаючись прийнятною ($\leq 10\%$) як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності. Метод імуноферментного аналізу визнано валідованим, а діагностичний набір стабільним упродовж 1 року.
Ключові слова: імуноферментний аналіз, валідація, антитіла, *Chlamydia trachomatis*.

ВСТУП

Оцінка придатності аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей. Валідація аналітичних методик являє собою процедуру експериментального доведення того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань [1]. Слід зазначити, що засоби для серологічної *in vitro* діагностики 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 [2]. 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 Державної фармакопеї України до даного виду продукції [2]. 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.

Мета роботи – обґрунтування процедури та проведення валідації імуноферментного аналізу (ІФА), що призначений для якісного (напівкількісного) визначення специфічних IgA-антитіл до *Ch. trachomatis*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Науково-методичне обґрунтування параметрів аналітичної якості та стандартизації виробництва засобів для серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань», яка виконується на кафедрі промислової біотехнології НТУУ «КПІ».

Діагностичні набори. У роботі було загалом використано 3 дослідно-промислові серії набору, які досліджували відразу після виготовлення та через 1 рік – наприкінці строку придатності (як елемент дослідження стабільності набору).

Панель сироваток. Для проведення валідації використовували власне сформовану внутрішньовиробничу панель сироваток (ВВП). Позитивні зразки формували із сироваток крові пацієнтів, що містили антитіла класу IgG до *Ch. trachomatis* та мали позитивні результати полімеразної ланцюгової реакції при виявленні ДНК збудника в урогенітальному мазку. Такі сироватки досліджували із використанням діагностичних наборів «ХламиБест-С.trachomatis IgA», Вектор-Бест, Росія, та «Chlamydien-IgA-rELISA medac», Medac, Німеччина. Для включення до ВВП відбирали лише ті зразки, які давали позитивні результати за всіма видами досліджень. Негативні зразки не містили специфічних до *Ch. trachomatis* IgA-антитіл. Серед негативних зразків було відібрано 5 сироваток, які містили IgM-антитіла до збудника урогенітального хламідіозу, та 15 зразків, що були позитивними на відповідні IgG-антитіла (дані сироватки використовували для оцінки аналітичної чутливості аналізу).

Непрямий варіант ІФА. Рекомбінантний білок зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері на 96-лункові планшети для твердофазного ІФА. Планшет інкубували протягом 12 год при 4 °С, тричі відмивали фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2–7,4 та витримували у розчині БСА (10 мг/мл в ФСБ) 1 год при 37 °С. Планшети висушували у вакуум-втяжній шафі та герметично запаювали у поліетиленові пакети. У такому вигляді планшети зберігалися до постановки аналізу. Перед постановкою аналізу лунки планшету заповнювали 90 мкл буферного розчину для розведення сироваток (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) та 30 мкл досліджуваного

зразку сироватки (для розведення 1:4); суміш інкубували 60 хв за температури 37 °С. Після інкубації лунки планшету тричі промивали по 300 мкл ФСБТ та вносили розчин кон'югату моноклональних антитіл до IgA людини із ферментом пероксидазою хрому; суміш інкубували 30 хв за температури 37 °С. Після інкубації лунки планшету чотири рази промивали по 300 мкл ФСБТ та вносили субстратно-хромогенний розчин (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, 0,003 % H₂O₂, 0,15 М цитратний буфер, рН 5,0). Після зупинки ферментативної реакції вимірювали оптичну густину (ОГ) розчину у лунках при довжині хвилі 450 нм.

Математичні (статистичні) методи. Статистичну обробку експериментальних даних проводили із використанням відповідних рекомендацій [1,3,4], а також програмного комплексу Microsoft Excel.

Рівень граничного значення (ГЗ) розраховували за формулою (1)

$$ГЗ = ОГ_{сер} + 3\sigma, \quad (1)$$

де $ОГ_{сер}$ – значення середньої ОГ негативних зразків, σ – середньоквадратичне відхилення (дисперсія) значень ОГ негативних сироваток [5].

Процент позитивності (ПП) розраховували за формулою (2)

$$ПП = ГЗ / ОГ_{ст.К+}, \quad (2)$$

де ГЗ – граничне значення, $ОГ_{ст.К+}$ – ОГ певного позитивного стандарту.

Коефіцієнт варіації (CV) результатів аналізу розраховували за формулою (3)

$$CV = SD \times 100\% / X_{сер}, \quad (3)$$

де SD – стандартне відхилення певної величини, $X_{сер}$ – середнє арифметичне значення певної величини.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка чутливості та специфічності аналізу. Як відомо діагностична специфічність (ДС) характеризує спроможність методу визначати лише той компонент, для виявлення котрого він призначений, тобто характеризує здатність відповідного засобу реєструвати мінімальну кількість хибнопозитивних результатів. У той час як діагностична чутливість (ДЧ) являє собою показник, який характеризує здатність методу виявляти максимальну кількість дійснопозитивних зразків. У випадку дослідження на наявність аналітів інфекційного походження ДЧ відображає долю інфікованих осіб, котрі можуть бути виявлені при використанні даного аналізу [6]. Визначення ДЧ та ДС імуноферментних наборів проводять із використанням різноманітних панелей сироваток: негативних, позитивних низькотитражних та сероконверсійних. Такі панелі сироваток виготовляються у вигляді комерційного продукту та використовуються багатьма розробниками і виробниками ІФА-наборів (наприклад, SeraCare Life Sciences/Boston Biomedical Inc., США, Науковий центр експертизи засобів медичного застосування, Росія, Медико-біологічний Союз, Росія) або створюються виробниками самостійно для власного використання (так звані внутрішньовиробничі панелі сироваток). Зважаючи на те, що панелі сироваток для оцінки діагностичної якості ІФА-наборів для діагностики урогенітального хламідіозу не є поширеними, ми були змушені формувати власну ВВП (20 позитивних та 50 негативних зразків).

Ключовим моментом у визначенні ДЧ та ДС якісного (напівкількісного) ІФА є встановлення рівня граничного значення (Cut-off). Існують різні методологічні підходи для розрахунку ГЗ. Більш універсальним підхід адресується до використання формули (1) [6], у той же час інші дослідники встановлюють даний показник як частку (10...20%) від максимального результату, отриманого при тестуванні високотитражних сироваток [10], використовуючи такий показник як процент позитивності (ПП). Кількісний розподіл досліджуваних сироваток за діапазонами ПП представлено на рис. 1 (дослідження проводили із набором дослідно-промислової серії 0113 у першій місяць після виготовлення). ГЗ, розраховане за формулою (1), склало 0,156 оптичних одиниць (о.о.), що відповідає 8 % ПП. Результати тестування сироваток ВВП оцінювали залежно від різного рівня ГЗ та розраховували відповідні значення ДЧ та ДС (рис. 2). Отримані дані свідчать про те, що встановлення ГЗ на рівні 8 % ПП забезпечує найкращі значення для обох показників ДЧ та ДС (100%).

Аналітичну специфічність (АС) аналізу оцінювали із використанням 15 зразків ВВП, які не містили IgA-антитіла до збудника уrogenітального хламідіозу: 5 сироваток, які містили IgM-антитіла, та 15 зразків, що були позитивними на IgG-антитіла. Дані IgM-негативні зразки використовували для розведення позитивних сироваток (як альтернативу розчину для розведення сироваток) та досліджували коефіцієнти варіації в межах однієї постановки аналізу (CV) у 4-х повторях для різних зразків. Показник CV знаходився у межах від 3% до 8%, що є цілком задовільним, та дає можливість стверджувати, що присутність у досліджуваних зразках антитіл аналогічної специфічності інших класів не впливає на ДС (АС є прийнятною).

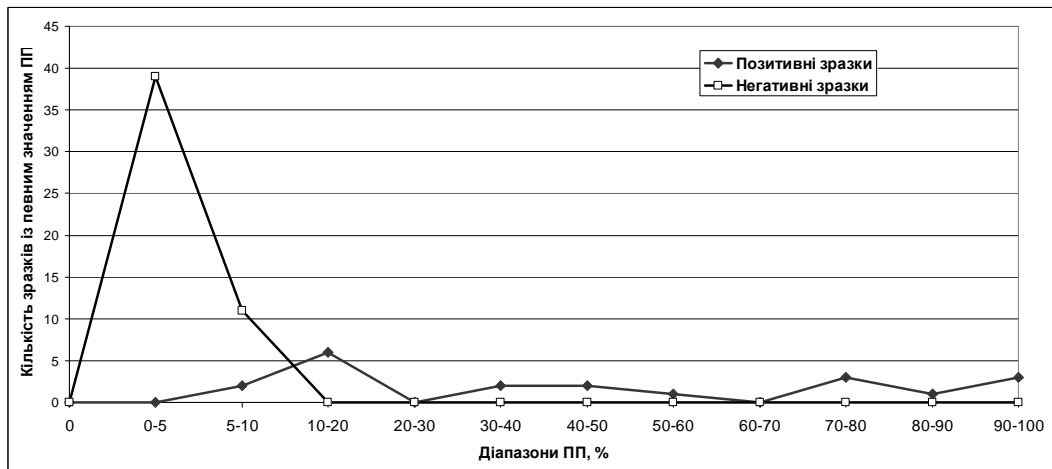


Рис. 1. Розподіл досліджуваних сироваток ВВП за діапазонами проценту позитивності

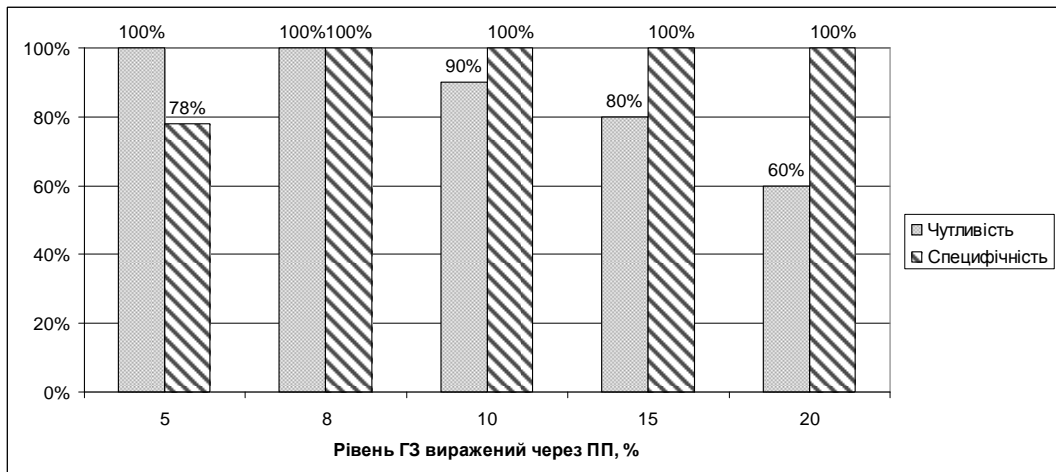


Рис. 2. Залежність діагностичних чутливості та специфічності аналізу від встановленого рівня ГЗ

Аналогічні дослідження із визначення ДЧ, ДС та АС проводили із набором серії 0113 через 1 рік після його виготовлення (на момент закінчення строку придатності) для підтвердження його стабільності. Було отримано наступні результати: ГЗ становило 0,169 о.о. (9 % ПП), ДЧ та ДС склали по 100 %, при оцінці АЧ аналізу CV не перевищував 10 %. Таким чином, валідаційні характеристики на момент закінчення терміну придатності залишилися цілком прийнятними.

Оцінка межі виявлення та лінійності. Очевидно, що для якісного (напівкількісного) аналізу не можливо встановити абсолютну межу виявлення (аналітичну чутливість), проте ми пропонуємо оцінити даний показник шляхом титрування низькотитражних позитивних сироваток. На рис. 3 представлено результати титрування трьох позитивних зразків ВВП, у порівнянні із аналогічним дослідженням трьох негативних сироваток. Дві із трьох позитивних сироваток засвідчили позитивний результат лише у розведенні 1 : 4 (зразки 1 та 2), одна давала позитивний результат ще й у розведенні 1 : 8 (зразок 8).

Лінійність аналізу оцінювали при титруванні високотитражних сироваток ВВП, використовуючи отримані дані для отримання рівняння лінійної регресії (рис. 4). Відповідні дослідження проводили із набором дослідно-промислової серії 0113 у першій місяць після виготовлення. Коефіцієнти нахилу графіку лінійної регресії знаходилися у діапазоні 1,473-1,698, що є прийнятним для якісного аналізу [1, 3, 8]. Коефіцієнти кореляції (r) між експериментальними та теоретичними значеннями ОГ порівнювали із критичним значенням для різних рівнів достовірності [4]. Отримані результати (табл. 1) свідчать про прийнятний рівень відповідності експериментальних даних та результатів ОГ, розрахованих за рівнянням лінійної регресії для трьох досліджених зразків сироваток. Результати титрування високотитражних сироваток та оцінки лінійності на момент закінчення терміну придатності імуноферментного набору представлені у табл. 2 й свідчать про збереження задовільного рівня досліджуваних характеристик через рік зберігання

імуноферментного набору. Зазначимо також, що коефіцієнти кореляції між значеннями ОГ, отриманими в експерименті на момент випуску та на момент закінчення терміну придатності для досліджених сироваток знаходилися у діапазоні 0,996-0,999, що є додатковим свідченням задовільного рівня стабільності імуноферментного набору.

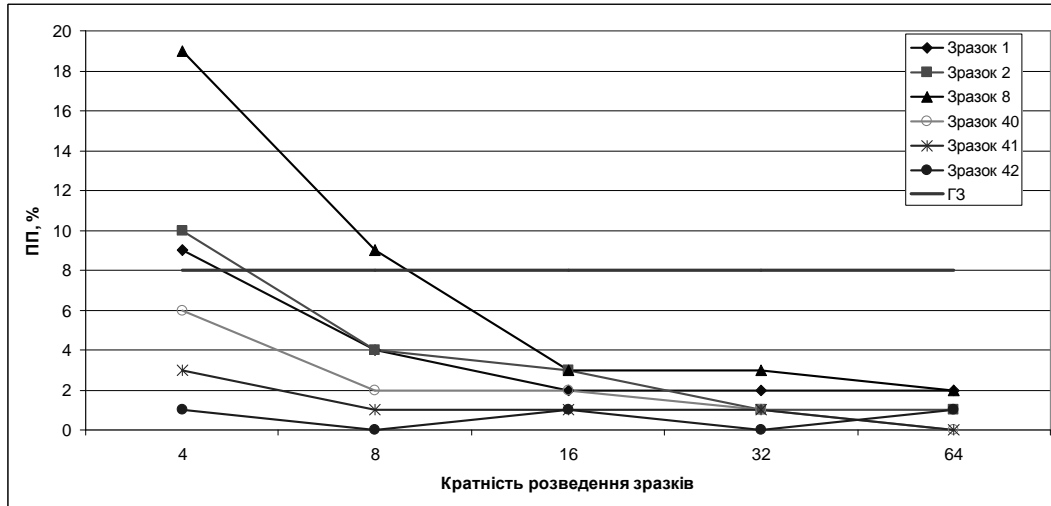


Рис. 3. Встановлення відносної аналітичної чутливості аналізу

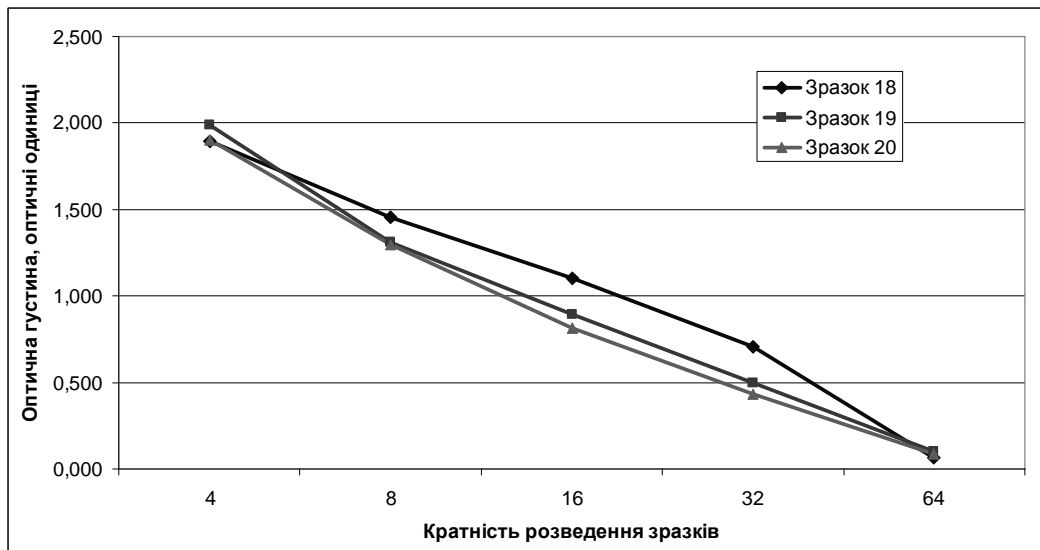


Рис. 4. Встановлення лінійності аналізу із використанням високотитражних сироваток на момент випуску імуноферментного набору

Таблиця 1
Результати титрування високотитражних сироваток та оцінка лінійності на момент випуску імуноферментного набору

№ зразка	Значення ОГ* для різних розведень зразків сироваток					Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції r та його рівень достовірності [4]
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
18	1,895/ 1,598	1,455/ 1,497	1,100/ 1,296	0,705/ 0,895	0,062/ 0,091	$y = 1,731x - 0,028$	0,963 ($p \leq 0,01$)
19	1,988/ 1,500	1,311/ 1,399	0,891/ 1,198	0,495/ 0,795	0,098/ -0,009	$y = 1,621x - 0,027$	0,893 ($p \leq 0,05$)
20	1,902/ 1,376	1,100/ 1,279	0,812/ 1,298	0,429/ 0,695	0,085/ -0,083	$y = 1,552x - 0,026$	0,887 ($p \leq 0,05$)

* Значення ОГ наведено у форматі експериментальне/теоретичне. Представлені середні арифметичні значення експериментальних значень ОГ за результатами досліджень у 5-и повторях.

Таблиця 2
Результати титрування високотитражних сироваток та оцінка лінійності на момент закінчення терміну придатності імуноферментного набору

№ зразка	Значення ОГ* для різних розведень зразків сироваток					Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції r та його рівень достовірності [4]
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
18	1,906/ 1,578	1,364/ 1,474	1,118/ 1,264	0,642/ 0,845	0,259/ 0,008	$y = 1,683x - 0,026$	0,944 ($p \leq 0,02$)
19	1,972/ 1,520	1,354/ 1,411	0,888/ 1,193	0,466/ 0,756	0,184/ -0,116	$y = 1,629x - 0,027$	0,898 ($p \leq 0,05$)
20	1,881/ 1,404	1,208/ 1,304	0,825/ 1,104	0,415/ 0,705	0,115/ -0,093	$y = 1,507x - 0,025$	0,879 ($p \leq 0,05$)

* Значення ОГ наведено у форматі експериментальне/теоретичне. Представлені середні арифметичні значення експериментальних значень ОГ за результатами досліджень у 5-и повторях.

Визначення прецизійності аналізу. Як відомо прецизійність може розглядатися на різних рівнях, зокрема: збіжність (intra assay variation) характеризує варіації при постановках аналізу за тих самих умов протягом невеликого проміжку часу; внутрішньолабораторна прецизійність (inter assay variation) враховує внутрішньолабораторні варіації; відтворюваність характеризує ступінь близькості результатів при міжлабораторному експерименті. У нашій роботі ми оцінювали: збіжність при дослідженні сироваток позитивного та негативного контролів в рамках однієї постановки у 4-х повторях на 4-х ІФА-планшетах, виражену через коефіцієнт варіації CV_{intra} ; внутрішньолабораторну прецизійність при дослідженні сироваток позитивного та негативного контролів в рамках 3-х постановок у різні дні різними операторами на різних серіях набору виражену через коефіцієнт варіації CV_{inter} . Результати відповідних експериментів представлені у табл. 3 та 4. Середне

БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ...

значення збіжності (CV_{intra}) для досліджень на момент випуску склав 5,3 %, а на момент закінчення терміну придатності – 6,2 %. Внутрішньолабораторна прецизійність аналізу при використанні різних серій набору на момент випуску коливалася у межах від 3,3 % до 9,6 % (середнє значення CV_{inter} 5,8 %), а на момент закінчення терміну придатності – від 2,5 % до 8,7 % (середнє значення CV_{inter} 5,6 %). За різними рекомендаціями прийнятними є різні значення CV_{intra} та CV_{inter} : одні автори рекомендують встановлювати нормування даних показників як $CV \leq 10\%$ [9], інші вважають прийнятними результати при не перевищенні даних показників межі у 20 % [8]. Отримані нами результати прецизійності аналізу свідчать про їх прийнятність як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності набору.

Таблиця 3

Результати дослідження збіжності імуноферментного аналізу

Планшет	ОГ у повторах	Середня ОГ для планшету	Середня ОГ для всіх планшетів	Стандартне відхилення	CV_{intra}
Для позитивного контролю					
На момент випуску					
1	1,115; 1,101; 1,108; 1,251	1,144	1,156	0,050	4,3%
2	1,221; 1,205; 1,101; 1,119	1,162			
3	1,122; 1,158; 1,160; 1,133	1,143			
4	1,209; 1,110; 1,166; 1,220	1,176			
На момент закінчення терміну придатності					
1	1,122; 1,118; 1,123; 1,241	1,151	1,171	0,073	6,2%
2	1,210; 1,204; 1,115; 1,214	1,186			
3	1,116; 1,167; 1,154; 1,066	1,126			
4	1,225; 1,109; 1,188; 1,366	1,222			
Для негативного контролю					
На момент випуску					
1	0,038; 0,036; 0,033; 0,035	0,036	0,037	0,002	5,5%
2	0,036; 0,039; 0,035; 0,037	0,037			
3	0,039; 0,040; 0,038; 0,035	0,038			
4	0,037; 0,034; 0,038; 0,039	0,037			
На момент закінчення терміну придатності					
1	0,036; 0,037; 0,031; 0,032	0,034	0,034	0,002	6,8%
2	0,037; 0,034; 0,032; 0,036	0,035			
3	0,032; 0,035; 0,038; 0,034	0,035			
4	0,033; 0,035; 0,031; 0,037	0,034			

Таблиця 4

Результати дослідження внутрішньолабораторної прецизійності імуноферментного аналізу

Постановка/ серія набору	ОГ у повторях	Середня ОГ для постановки	Стандартне відхилення	CV _{intra}	Середнє значення CV _{intra}
Для позитивного контролю					
На момент випуску					
1 / 0113	1,115; 1,101; 1,108; 1,251	1,144	0,072	6,3%	4,5%
2 / 0213	1,154; 1,231; 1,162; 1,127	1,169	0,044	3,8%	
3 / 0313	1,266; 1,321; 1,352; 1,264	1,301	0,043	3,3%	
На момент закінчення терміну придатності					
1 / 0113	1,122; 1,118; 1,123; 1,241	1,151	0,060	5,2%	4,0%
2 / 0213	1,166; 1,214; 1,255; 1,137	1,193	0,052	4,4%	
3 / 0313	1,274; 1,216; 1,219; 1,268	1,244	0,031	2,5%	
Для негативного контролю					
На момент випуску					
1 / 0113	0,038; 0,036; 0,033; 0,035	0,036	0,002	5,9%	7,1%
2 / 0213	0,036; 0,031; 0,038; 0,032	0,034	0,003	9,6%	
3 / 0313	0,045; 0,040; 0,041; 0,040	0,042	0,002	5,7%	
На момент закінчення терміну придатності					
1 / 0113	0,036; 0,037; 0,031; 0,032	0,034	0,003	8,7%	7,3%
2 / 0213	0,037; 0,035; 0,034; 0,033	0,035	0,002	4,9%	
3 / 0313	0,044; 0,049; 0,040; 0,046	0,045	0,004	8,4%	

ВИСНОВКИ

1. На прикладі імуноферментного набору для якісного (напівкількісного) визначення специфічних IgA-антитіл до *Ch. trachomatis* 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).
2. Показники діагностичної чутливості та специфічності, встановлені за допомогою внутрішньовиробничої панелі сироваток (2 позитивних та 50 негативних зразків) склали 100 %.
3. Присутність у досліджуваних зразках антитіл класів IgG та IgM до збудника уrogenітального хламідіозу не впливала на коректність визначення специфічних IgA-антитіл.
4. Лінійність методики є задовільною як для якісного виду аналізу. Збіжність результатів аналізу знаходилася у межах від 3,4 % до 6,8 %, а внутрішньолабораторна прецизійність – від 4,0 % до 7,3 %, залишаючись прийнятною (≤ 10 %) як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності.

5. Імуноферментний аналіз визнано валідованим із задовільними результатами, а діагностичний набір – стабільним упродовж 1 року.

Список літератури

1. Державна фармакопея України. Перше видання. Доповнення 2 // Під ред. О.І. Гризодуба. – Х.: РІРЕГ, 2008. – 617 с.
2. Галкін О.Ю. Параметри біоаналітичної стандартизації засобів для серологічної діагностики / О.Ю. Галкін // Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (16-17 жовтня 2014 р., м. Харків). – Х., 2014. – С. 74–75.
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. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / В.Ю. Урбах. – М.: Издательство АН СССР, 1963. – 321, [1] с.
5. Гураль А.Л. К проблеме оценки диагностических характеристик тест-систем для выявления антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) / А.Л. Гураль, Т.А. Сергеева, Е.Н. Кислых // Лабораторная диагностика. – 1999. – №1. – С. 50–54.
6. 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.
7. 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 et al. // J. Virol. Meth. – 2010. – Vol. 169, 1. – P. 143–153.
8. Ederveen J.C. A practical approach to biological assay validation / J.C. Ederveen. – Hoofddorp: Progress, 106 [1] p.
9. Schultheiss O.C. Assessment of salivary hormones / O.C. Schultheiss, S.J. Stanton // Methods in Social Neuroscience / Editors E. Harmon-Jones, and J.S. Beer. – New York: Guilford Press, 2009. – P. 17–44.

Галкин А.Ю. Биоаналитическая валидация иммуноферментного анализа для качественного (полуколичественного) определение антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis* / А.Ю. Галкин, Ю.В. Горшунов, А.Б. Бесараб // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 3. – С.14-25.

Целью данного исследования являлось научно-методическое обоснование процедуры валидации средства для серологической *in vitro* диагностики на примере иммуноферментного набора для качественного (полуколичественного) определение специфических антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis*. Валидационные характеристики (прецизионность, диагностическая и аналитическая специфичность, диагностическая чувствительность, относительная линейность) определяли как на момент выпуска диагностического набора, так и на момент окончания срока годности (как элемент исследования стабильности). Показатели диагностической чувствительности и специфичности установленные при помощи внутрипроизводственной панели сывороток (20 положительных и 50 отрицательных) составили 100 %. Присутствие в исследуемых образцах антител других классов к возбудителю урогенитального хламидиоза не влияло на корректность анализа по определению специфических антител класса IgA. Линейность методики была удовлетворительной. Сходимость результатов анализа находилась в пределах от 3,4% до 6,8%, а внутрилабораторная прецизионность – от 4,0 % до 7,3 %, оставаясь приемлемой ($\leq 10\%$) как на момент выпуска, так и на момент истечения срока годности. Метод иммуноферментного анализа признано валидированным, а диагностический набор стабильным на протяжении 1 года.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, валидация, антитела, *Chlamydia trachomatis*.

BIOANALYTICAL VALIDATION OF THE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE (SEMI-QUANTITATIVE) DETERMINATION OF IGA CLASS ANTIBODIES TO *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Galkin A.Yu.¹, Gorshunov Yu.V.², Besarab A.B.¹

¹*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine*

²*Research and Design-Technological Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine*

E-mail: alexfbt@mail.ru

Evaluation of the suitability of analytical methods is one of the most important elements of the quality management system in pharmaceutical and biotech industries. Validation of analytical methods is a procedure of experimental proof that the method is suitable for solving the tasks. It should be noted that the medical device for serological *in vitro* diagnostic have several features and differences from pharmaceutical preparations, through their bioanalytical approaches to standardization are different from similar approaches used in the case of drugs. Previously we have analyzed the requirements of national and international regulations concerning the quality and safety of medical devices for *in vitro* diagnostics and discussed the possibility of a partial application of the recommendations of the State Pharmacopoeia of Ukraine for this type of products. We have determined that the parameters bioanalytical standardization and validation characteristics for qualitative (semi-quantitative) tools for serological diagnosis can be precision (convergence, intra laboratory precision and reproducibility), diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, and for quantitative – in addition correctness (accuracy) linearity, analytical sensitivity and range of application. Given the lack of national guidelines for bioanalytical methods validation used in serological diagnosis, we consider it extremely important to the creation of scientific and methodological recommendations for the validation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test-kits for qualitative and quantitative determination of different bioanalytes.

The aim of this study was scientific and methodical substantiation of validation procedures for medical device for serological *in vitro* diagnostic, for example, the enzyme immunoassay test-kit for the qualitative (semi-quantitative) determination of specific IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis*. This work is a part of research “Scientific-methodical study of analytical parameters of quality and standardization of production facilities for serological diagnosis of infectious and non-infectious diseases”, which performed at the Department of Industrial Biotechnology of NTUU “KPI”.

The validation characteristics (precision, diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, relative linearity) was measured both at the time of manufacture of a diagnostic kit as well as at the expiration date (stability study). Diagnostic sensitivity (DSe) and specificity (DSp) were determined by means of intraindustrial sera panel (20 positive and 50 negative samples) because the sera panel for assessing the quality of diagnostic ELISA kits for diagnosis of urogenital chlamydiosis is not common (20 positive and 50 negative samples). The key point in determination of DSe and DSp for the qualitative (semi-quantitative) ELISA is to establish cut-off level. There are various methodological approaches to calculate cut-off level, but we are use the most universal

approach (average optical density of negative samples plus triple standard deviation). Using this approach DSe and DSp indicators were 100%. The presence of antibodies of other classes (IgG, and IgM) to *Ch. trachomatis* not affect the validity of the analysis to identify specific antibodies of class IgA. The linearity of the methods was satisfactory. Precision can be seen at various levels, including: repeatability (intra assay variation) describes variations in performances analysis under the same conditions in a short period of time; inter-mediate precision (inter assay variation) describes the impact inter laboratory variations; reproducibility characterizes the degree of closeness results in inter-laboratory experiment. In our work we assessed: the convergence of the study sera positive and negative controls in one setting in 4 repetitions at 4 ELISA plates; inter-mediate precision in the study of positive and negative serum controls within 3 performances on different days by different operators in different kit series. Repeatability of analysis ranged from 3.4% to 6.8%, and intermediate precision – from 4.0% to 7.3%, while remaining acceptable ($\leq 10\%$) as at the time of manufacture and at the expiration date. Enzyme immunoassay has been recognized as validated and diagnostic kit stable for 1 year.

Keywords: enzyme immunoassay, validation, antibodies, *Chlamydia trachomatis*.

References

1. State Pharmacopoeia of Ukraine, First Edition, Appendix 2, Ed. A.I. Hryzodub (RIREG, Kharkiv, 2008).
2. Galkin O.Yu., Options bioanalytical tools for standardizing the serological diagnosis, *Abstract of the IV International scientific and practical conference "Recent advances in pharmaceutical technology and biotechnology"* (Kharkiv, 2014), p. 74–75.
3. RIS 61–2010, State system for ensuring the uniformity of measurements. Indicators of precision, accuracy, precision methods of quantitative chemical analysis. Assessment methods (Standartinform, Moscow, 2012).
4. Urbach V.Yu., *Mathematical statistics for biologists and medical* (Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow, 1963).
5. Gural A.L., Sergeeva T.A, and Kislyh E.N., To the problem of the evaluation of diagnostic performance test-systems for the detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV), *Laboratory diagnosis*, **1**, 50 (1999).
6. Galkin O.Yu., Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases, *Ukrainian J. Clin. Labor. Med.*, **5** (4), 54 (2010).
7. Parreno V., Romera S.A., Makek L., Rodriguez D., Malacari D., Maidana S., Compaired D., Combessies G., Vena M.M., Garaicoechea L., Wigdorovitz A., Marangunich L., Fernandez F., Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards, *J. Virol. Meth.*, **169** (1), 143, 2010.
8. Ederveen J.C., *A practical approach to biological assay validation* (Progress, Hoofddorp, 2010).
9. Schultheiss O.C. and Stanton S.J., Assessment of salivary hormones / *Methods in Social Neuroscience*. Editors E. Harmon-Jones and J.S. Beer (Guilford Press, New York, 2009).

Поступила в редакцію 26.10.2014 з.