

БІОЛОГІЧНІ ТА МЕДИЧНІ ПРИЛАДИ І СИСТЕМИ

УДК 615. 07(045)

Л. А. КОШЕВАЯ

Национальный авиационный университет, г. Киев

МОДИФИКАЦИЯ РЕШАЮЩИХ ПРАВИЛ ПРИ ПРИНЯТИИ РЕШЕНИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Анотація: Невизначеність кількісних результатів біологічних випробувань, викликана недосконалістю процедури розведення, обумовлює необхідність введення додаткових зон, при знаходженні результату в яких існує невизначеність прийняття рішення про відповідність препарату встановленим вимогам. Запропоновано метод корекції вирішальних правил для встановлення меж зон невизначеності.

Ключові слова: біологічні випробування, контроль якості, вирішальне правило, невизначеність, процедура розведення

Аннотация: Неопределенность количественных результатов биологических испытаний, вызванная несовершенством процедуры разведения, обуславливает необходимость введения дополнительных зон, при нахождении результата в которых существует неопределенность принятия решения о соответствии препарата установленным требованиям. Предложен метод коррекции решающих правил для установления границ зон неопределенности.

Ключевые слова: биологические испытания, контроль качества, решающее правило, неопределенность, процедура разведения

Abstract The uncertainty of the quantitative results of biological testing due imperfect procedure breeding, causes necessity of the introducing additional zones. If the result is in these areas, there is uncertainty of the decision about according product to specified requirements. Proposed correction method of decision rules for delineating areas of uncertainty.

Key words: Biological testing, quality control, decision rule, the uncertainty, the process of breeding.

Введение

Согласно стандартам и положениям Фармакопеи Украины [1], устанавливающим нормы качества медицинских препаратов, для проверки их качества необходимо проведение биологических испытаний. Биологические методы контроля качества препаратов весьма разнообразны. Среди них испытания на токсичность, стерильность, микробиологическую чистоту и т.д. Оценивание показателей биологических испытаний осуществляются с помощью физических и физико-химических методов, в которых используются стандартные процедуры, в частности приготовление растворов, основанное на многократных разведениях в известных пропорциях исходного раствора различными растворителями в соответствии с принятой схемой. В большинстве случаев результатом биологического испытания является определение количества микроорганизмов в препарате, которое может составлять сотни тысяч единиц, для подсчета которых производят многоступенчатое разведение исходного препарата. Ранее в работах [2, 3] были предложены подходы к оцениванию неопределенности коэффициента разведения, значение которого, а также метрологические характеристики применяемых средств измерений, с очевидностью влияют на конечный результат биологических испытаний. Так, было получено выражение для оценки неопределенности, которое позволяет с учетом метрологических характеристик применяемого измерительного оборудования обоснованно выбирать схему разведения, обеспечивающую с наименьшей неопределенностью реализацию заданного значения.

На основании полученного результата испытаний делают заключение о качестве исследуемого препарата. Из-за влияния эффектов случайного и систематического характеров при оценке результатов контрольных испытаний существуют некоторые интервалы в окрестностях нижней и верхней границ нормы, при нахождении в которых значений контролируемой величины, возникает неопределенность принимаемых решений. Особый интерес представляют значения контролируемого параметра, находящегося в границах верхнего или нижнего пределов нормы, где сильно влияние неопределенности получаемых при испытании количественных результатов.

Цель работы

Показать метод коррекции решающих правил для установления границ зон неопределенности принятия решения по результатам биологических испытаний

Постановка проблемы

В качестве примера рассмотрим определение специфической активности и термостабильности вакцины БЦЖ, на основании которых принимается решение о качестве вакцины. На рис. 1 изображена последовательно-параллельная схема проведения испытаний вакцины БЦЖ.

Испытание вакцины БЦЖ по этим показателям проводится в три этапа [4].

Этап 1: Многократное разведение исходной суспензии, полученной путем разведения сухого нативного препарата.

Этап 2: Высевание в питательную среду.

Этап 3: Подсчет количества колоний и вычисление результата.

Основная часть

Результатом по показателю специфической активности является количество жизнеспособных микобактерий на единицу массы препарата.

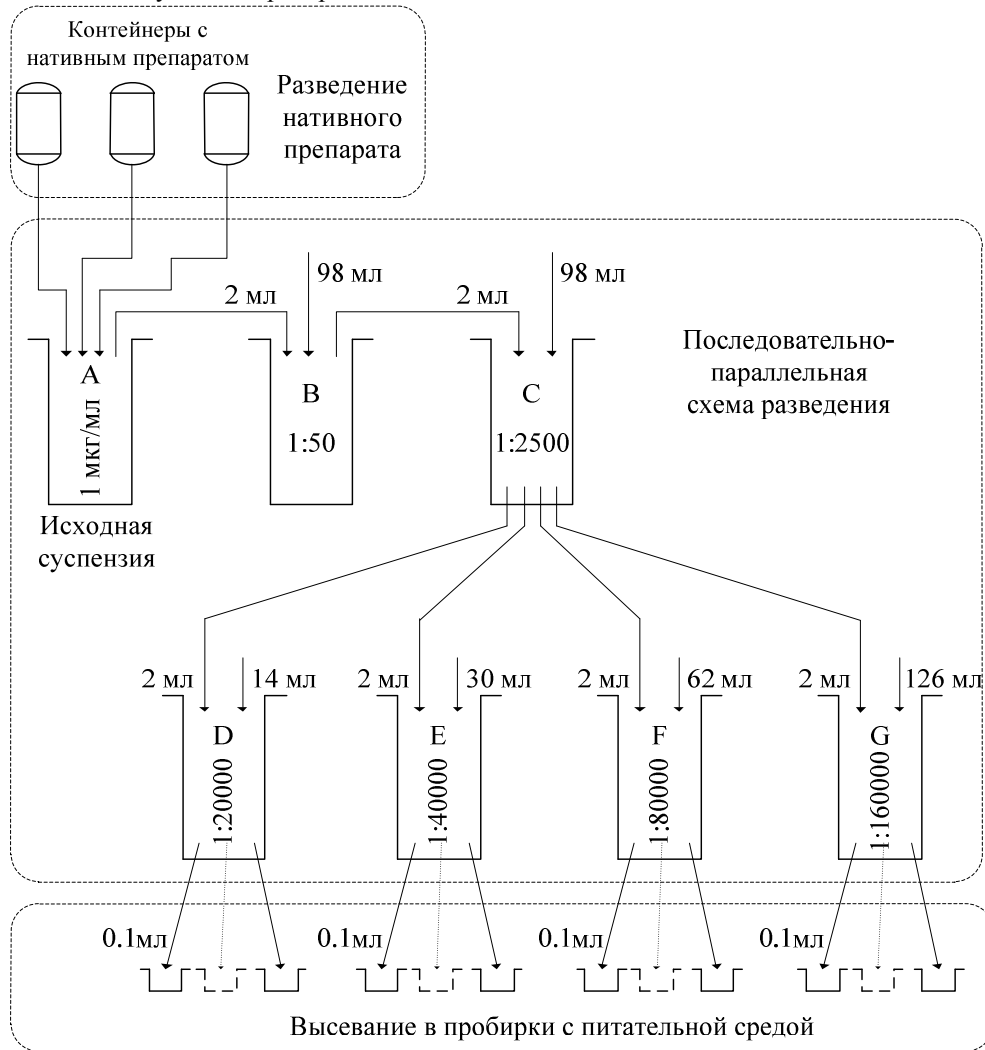


Рисунок 1 — Последовательно-параллельная схема проведения испытаний

Расчет количества жизнеспособных микобактерий в единице массы препарата R_i осуществляется по формуле из правого столбца табл. 1., которая отвечает решающему правилу из левого столбца.

Таблица 1 – Формулы для расчета количества жизнеспособных микобактерий в соответствии с решающим правилом

Решающее правило	Формула
$X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq 2X_3$	$R_1 = \frac{d_1}{V} \cdot 0,5(X_1 + X_2 + 2X_3)$ (1)
$X_1 + X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq X_2 + 2X_3$	$R_2 = \frac{d_2}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_1}{(2\omega + X_1 - X_2 - 2X_3)}$ (2)
$X_2 + 2X_3 \geq 2\omega \geq 2X_3$	$R_3 = \frac{d_3}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_2}{(2\omega + X_2 - 2X_3)}$ (3)
$2X_3 \geq 2\omega$	$R_4 = \frac{d_3}{V} \cdot X_3$ (4)

В табл. 1 использованы такие обозначения: X_1, X_2, X_3 — средние значения количества колоний

$d_1 = d_E$ при кратности разведений d_1, d_2, d_3 ; $d_1 = d_E$; $d_2 = d_F$; $d_3 = d_G$ при испытаниях на специфическую активность неинкубированных образцов и $d_1 = d_D$; $d_2 = d_E$; $d_3 = d_F$ при испытаниях на специфическую активность инкубированных образцов; индексы D, E, F, G соответствуют номерам флаконов для разведения в соответствии с рис. 1; $V = 0,1$ мл — объем высевной суспензии; $\omega = 40$ — постоянное число. На рис. 2 приведена графическая интерпретация табл. 1.

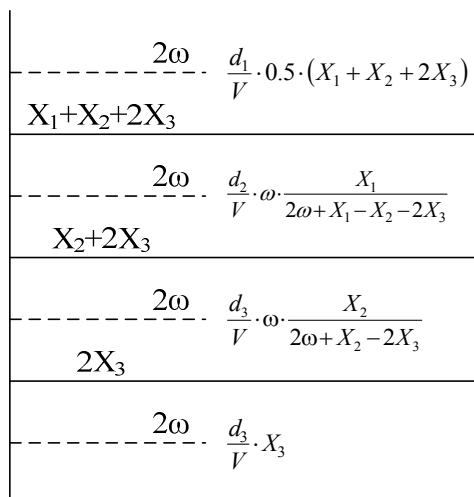


Рисунок 2 – Графическая интерпретация табл. 1

Решающие правила, представленные в табл. 1, предполагают отсутствие неопределенности границ $(X_1 + X_2 + 2X_3)$, $(X_2 + 2X_3)$, $(2X_3)$.

Однако, на практике эти границы будут иметь неопределенность, т. к. они вычисляются на основании данных, полученных экспериментальным путем. Наличие неопределенности предполагает представление каждой границы в виде интервала, что приводит к необходимости коррекции решающих правил.

Коррекция решающих правил.

Средние значения количества колоний X_1, X_2, X_3 вычисляются соответственно по формулам:

$$X_1 = \frac{\sum_{i=1}^{N_1} X_{1i}}{N_1}$$

$$X_2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_2} X_{2i}}{N_2}; X_3 = \frac{\sum_{i=1}^{N_3} X_{3i}}{N_3},$$

где X_{1i}, X_{2i}, X_{3i} — количество колоний в i -м высевании разведений d_1, d_2, d_3 соответственно; $N_1 = 4$, $N_2 = 4$ и $N_3 = 8$ — количество пробирок с питательной средой, в которые производятся высевания из разведений d_1, d_2, d_3 соответственно.

Стандартные отклонения (неопределенность по типу А) средних значений количества колоний определяются соответственно по формулам:

$$u(X_1) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x_{1i} - x_1)^2}{N_1(N_1 - 1)}}; u(X_2) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_2} (x_{2i} - x_2)^2}{N_2(N_2 - 1)}}; u(X_3) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_3} (x_{3i} - x_3)^2}{N_3(N_3 - 1)}}$$

Стандартное отклонение верхней границы $u(X_1 + X_2 + 2X_3)$ определяется выражением:

$$u(X_1 + X_2 + 2X_3) = \sqrt{\left(\frac{\partial L_1}{\partial x_1}\right)^2 u^2(X_1) + \left(\frac{\partial L_1}{\partial x_2}\right)^2 u^2(X_2) + \left(\frac{\partial L_1}{\partial x_3}\right)^2 u^2(X_3)}. \tag{5}$$

Стандартное отклонение $u(X_2 + 2X_3)$ определяется выражением:

$$u(X_2 + 2X_3) = \sqrt{\left(\frac{\partial L_2}{\partial x_2}\right)^2 u^2(X_2) + \left(\frac{\partial L_2}{\partial x_3}\right)^2 u^2(X_3)}. \tag{6}$$

Стандартное отклонение $u(2X_3)$ определяется выражением:

$$u(2X_3) = \sqrt{\left(\frac{\partial L_3}{\partial x_3}\right)^2 u^2(X_3)} \tag{7}$$

Расширенные неопределенности $U(X_1 + X_2 + 2X_3); U(X_2 + 2X_3); U(2X_3)$ вычисляются соответ-

венно как:

$$U(X_1 + X_2 + 2X_3) = ku(X_1 + X_2 + 2X_3); \tag{9}$$

$$U(X_2 + 2X_3) = ku(X_2 + 2X_3); \tag{10}$$

$$U(2X_3) = ku(2X_3), \tag{11}$$

где $k = 2$ — коэффициент охвата (предполагается нормальное распределение и $P = 0,95$).

Вычислив производные и подставив (5), (6), (7) в (8), (9), (10) соответственно, получим выражения:

$$U(X_1 + X_2 + 2X_3 = k\sqrt{u^2(X_1) + u^2(X_2) + 4u^2(X_3)});$$

$$U(X_2 + 2X_3 = k\sqrt{u^2(X_2) + 4u^2(X_3)});$$

$$U(2X_3) = k \cdot 2u(X_3)$$

Зона I	$\frac{d_1}{V} \cdot 0,5 \cdot (X_1 + X_2 + 2X_3)$
$X_1 + X_2 + 2X_3 + U(X_1 + X_2 + 2X_3)$	
$X_1 + X_2 + 2X_3$	Зона Ia
$X_1 + X_2 + 2X_3 - U(X_1 + X_2 + 2X_3)$	
Зона II	$\frac{d_2}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_1}{2\omega + X_1 - X_2 - 2X_3}$
$X_2 + 2X_3 + U(X_2 + 2X_3)$	
$X_2 + 2X_3$	Зона IIa
$X_2 + 2X_3 - U(X_2 + 2X_3)$	
Зона III	$\frac{d_3}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_2}{2\omega + X_2 - 2X_3}$
$2X_3 + U(2X_3)$	
$2X_3$	Зона IIIa
$2X_3 - U(2X_3)$	
Зона IV	$\frac{d_3}{V} \cdot X_3$

На рис. 3 штриховкой обозначены зоны неопределенности принятия решений. Если значение 2ω попадает в зону **I, II, III, IV**, то принимается абсолютно достоверное решение о вычислении результата по формулам (1), (2), (3) или (4) соответственно.

Заштрихованные зоны **Ia, IIa, IIIa** являются зонами неопределенности принятия решений. Если значение 2ω попадает в зону **Ia, IIa** или **IIIa**, то невозможно принять абсолютно достоверное решение по какой формуле ((1) или (2), (2) или (3), (3) или (4) соответственно) необходимо вычислять результат.

С учетом зон неопределенности принятия решений табл. 1 примет вид таблицы 2.

Рисунок 3 — Графическая интерпретация табл. 1 с учетом зон неопределенности принятия решений

Таблица 2 Модифицированное решающее правило с учетом зон неопределенности

Зона	Решающее правило	Формула
I	$X_1 + X_2 + 2X_3 + U(X_1 + X_2 + 2X_3) \geq 2\omega$	$R_1 = \frac{d_1}{V} \cdot 0,5(X_1 + X_2 + 2X_3)$
Ia	$X_1 + X_2 + 2X_3 + U(X_1 + X_2 + 2X_3) \geq 2\omega \geq X_1 + X_2 + 2X_3 - U(X_1 + X_2 + 2X_3)$	Зона неопределенности принятия решений
II	$X_1 + X_2 + 2X_3 - U(X_1 + X_2 + 2X_3) \geq 2\omega \geq X_2 + 2X_3 + U(X_2 + 2X_3)$	$R_2 = \frac{d_2}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_1}{(2\omega + X_1 - X_2 - 2X_3)}$
IIa	$X_2 + 2X_3 + U(X_2 + 2X_3) \geq 2\omega \geq X_2 + 2X_3 - U(X_2 + 2X_3)$	Зона неопределенности принятия решений
III	$X_2 + 2X_3 - U(X_2 + 2X_3) \geq 2\omega \geq 2X_3 + U(2X_3)$	$R_3 = \frac{d_3}{V} \cdot \omega \cdot \frac{X_2}{(2\omega + X_2 - 2X_3)}$
IIIa	$2X_3 + U(2X_3) \geq 2\omega \geq 2X_3 - U(2X_3)$	Зона неопределенности принятия решений
IV	$2X_3 - U(2X_3) \geq 2\omega$	$R_4 = \frac{d_3}{V} \cdot X_3$

Вычисление расширенной неопределенности результата. Расширенные неопределенности результатов вычисляются как произведение коэффициента охвата на положительные корни из квадратов стандартных отклонений соответствующих результатов:

$$U(R_i) = k\sqrt{u^2(R_i)},$$

где $k = 2$ — коэффициент охвата, предполагается нормальное распределение и $P = 0,95$. Тогда:

$$u^2(R_1) = \left(\frac{\partial R_1}{\partial d_1}\right)^2 u^2(d_1) + \left(\frac{\partial R_1}{\partial V}\right)^2 u^2(V) + \left(\frac{\partial R_1}{\partial X_1}\right)^2 u^2(X_1) + \left(\frac{\partial R_1}{\partial X_2}\right)^2 u^2(X_2) + \left(\frac{\partial R_1}{\partial X_3}\right)^2 u^2(X_3);$$

$$u^2(R_2) = \left(\frac{\partial R_2}{\partial d_2}\right)^2 u^2(d_2) + \left(\frac{\partial R_2}{\partial V}\right)^2 u^2(V) + \left(\frac{\partial R_2}{\partial X_1}\right)^2 u^2(X_1) + \left(\frac{\partial R_2}{\partial X_2}\right)^2 u^2(X_2) + \left(\frac{\partial R_2}{\partial X_3}\right)^2 u^2(X_3)$$

$$u^2(R_3) = \left(\frac{\partial R_3}{\partial d_3}\right)^2 u^2(d_3) + \left(\frac{\partial R_3}{\partial V}\right)^2 u^2(V) + \left(\frac{\partial R_3}{\partial X_2}\right)^2 u^2(X_2) + \left(\frac{\partial R_3}{\partial X_3}\right)^2 u^2(X_3)$$

$$u^2(R_4) = \left(\frac{\partial R_4}{\partial d_3}\right)^2 u^2(d_3) + \left(\frac{\partial R_4}{\partial V}\right)^2 u^2(V) + \left(\frac{\partial R_4}{\partial X_3}\right)^2 u^2(X_3)$$

где

$$u^2(V) = u^2(\Delta_p) + u^2(\Delta_p);$$

$u^2(d_1)$, $u^2(d_2)$, $u^2(d_3)$ — квадраты стандартных отклонений величин разведения d_1 , d_2 , d_3 соответственно и определяются по таблице 3.

Таблица 3 – Квадраты стандартных отклонений величин разведений

Случай испытания неинкубированных образцов	Случай испытания инкубированных образцов
$u^2(d_1) = u^2(d_E)$	$u^2(d_1) = u^2(d_D)$
$u^2(d_2) = u^2(d_F)$	$u^2(d_2) = u^2(d_E)$
$u^2(d_3) = u^2(d_G)$	$u^2(d_3) = u^2(d_F)$

Вычисление результата в зоне неопределенности принятия решений. Если значение 2ω попадает в зону неопределенности принятия решений, то невозможно принять достоверное решение по какой формуле необходимо вычислять результат. Из-за невозможности принятия достоверного решения, может быть совершена непреднамеренная ошибка.

При вычислении результатов R_{1a} , R_{2a} и R_{3a} в зонах *Ia*, *IIa* и *IIIa* рекомендуется пользоваться соотношениями:

$$R_{1a} = \begin{cases} R_1, \text{ если } U(R_1) < U(R_2) \\ R_2, \text{ если } U(R_2) < U(R_1) \end{cases};$$

$$R_{2a} = \begin{cases} R_2, \text{ если } U(R_2) < U(R_3) \\ R_3, \text{ если } U(R_3) < U(R_2) \end{cases};$$

$$R_{3a} = \begin{cases} R_3, \text{ если } U(R_3) < U(R_4) \\ R_4, \text{ если } U(R_4) < U(R_3) \end{cases}.$$

Расширенные неопределенности результатов R_{1a} , R_{2a} и R_{3a} рекомендуется представлять в виде объединения двух соответствующих неопределенностей:

$$U(R_{1a}) = U(R_1) \cup U(R_2)$$

$$U(R_{2a}) = U(R_2) \cup U(R_3)$$

$$U(R_{3a}) = U(R_3) \cup U(R_4)$$

Вычисление результатов по показателю термостабильности. Результатом по этому показате-

лю является процентное соотношение количества жизнеспособных микобактерий в образцах инкубированного препарата (инкубация образцов производится при 37°C на протяжении 28 дней) к количеству жизнеспособных микобактерий в образцах неинкубированного препарата.

Термостабильность определяется по формуле:

$$T = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100\%,$$

где A_2 — специфическая активность инкубированных образцов; A_1 — специфическая активность неинкубированных образцов. $U(T) = 100k \cdot u^2(T)$

Расширенная неопределенность $U(T)$ вычисляется как

$$U(T) = 100k \cdot u^2(T),$$

где

$$u^2(T) = \left(\frac{\partial T}{\partial A_2} \right)^2 u^2(A_2) + \left(\frac{\partial T}{\partial A_1} \right)^2 u^2(A_1) = 1000 \left(\frac{1}{A_1^2} u^2(A_2) + \frac{A_2^2}{A_1^4} u^2(A_1) \right);$$

$u^2(A_2)$ — стандартное отклонение результата по показателю специфической активности для случая испытания инкубированного образца $u^2(A_1)$ — неинкубированного образца.

Тогда

$$U(T) = k \cdot 100 \sqrt{\frac{1}{A_1^2} u^2(A_2) + \frac{A_2^2}{A_1^4} u^2(A_1)},$$

откуда следует, что неопределенность показателя термостабильности зависит от неопределенности специфической активности инкубированных и неинкубированных образцов.

Выводы

В результате влияния на результат испытаний неопределенности коэффициента разведения исходных материалов и реактивов при пробоподготовке возникает необходимость корректировать решающие правила, которые позволяют выбрать способ пересчета количества микроорганизмов в разведенном препарате в количестве микроорганизмов в исходном препарате. На основании полученного результата испытаний принимается решение о соответствии препарата требованиям. С помощью предложенного метода коррекции устанавливаются зоны неопределенности, при нахождении результата в которых, нельзя достоверно определить какое из решающих правил следует использовать.

Список литературы

1. Державна Фармакопея України. – Харків.: РІРЕГ. – 2008. – 605с.
2. Володарский Е.Т. Особенности оценивания неопределенности результатов биологических испытаний/Е.Т. Володарский Л.А. Кошечая/ Системы обработки информации.–2010.–Вып.4(85).–С.142-144.
3. Володарский Е.Т. Уменьшение неопределенности процедуры разведения растворов при аналитических исследованиях/Е.Т. Володарский, Л.А. Кошечая//Системы обработки информации. – Системы обработки информации. – 2011. – Вып.1 (91). – С.74-77.
4. Стандартна операційна процедура МОЗ України ДП «Центр імунологічних препаратів». Випробування вакцини БЦЖ за показниками «Специфічна активність», «Автентичність», «Термостабільність». Автор Макушенко О.С.– ред.№1.– 9 с.:іл.
5. Метрологія. Застосування «Руководства по выражению неопределенности измерений»: ДСТУ-Н РМГ 43:2006. – [Чинний від 2007-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 20 с. – (Національний стандарт України).

Информация об авторе

Кошечая Лариса Александровна, д.т.н., профессор кафедры биокрибернетики и аэрокосмической медицины, Национальный авиационный университет, просп. Космонавта Комарова, 1, Киев, 03058, Украина, тел / факс (044) 4067442, e-mail: arnis@ukrpost.net.