ΛΟΓΟΙ ΑΠΟΤΥΧΙΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (INCURRED SAMPLE REANALYSIS) ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Ιωάννης Ντότσικας
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου 157 71
e-mail: idotsik@pharm.uoa.gr

Περίληψη

Η επαναληπτική ανάλυση μετρηθέντων δειγμάτων (Incurred sample reanalysis, ISR) είναι ένας καινούργιος έλεγχος που απαιτούν οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του FDA και του EMA, ώστε να καταδειχθεί η αξιοπιστία των βιοαναλυτικών προσδιορισμών. Για έναν επιτυχή έλεγχο του ISR, οι κατευθυντήριες οδηγίες απαιτούν τουλάχιστον στο 67% των (άγνωστων) δειγμάτων η απόκλιση μεταξύ των 2 μετρήσεων να είναι εντός του 20% του μέσου όρου των 2 μετρήσεων. Ένας αποτυχημένος έλεγχος ISR απαιτεί διερεύνηση και αιτιολόγηση των αιτιών διαφορετικής απόδοσης της μεθόδου για τα πραγματικά δείγματα, έναντι των δειγμάτων επικύρωσής της. Στην αντίθετη περίπτωση, ένας επιτυχής έλεγχος ISR αυξάνει την εμπιστοσύνη στην αξιοπιστία των δεδομένων.
Μία σειρά πρόσφατων δημοσιεύσεων έχουν καταδείξει πως η επαναληπτική ανάλυση μέρους των μετρηθέντων δειγμάτων μπορεί να αποκαλύψει ποικίλα μεθοδολογικά ζητήματα ή ζητήματα χειρισμών που μπορεί να οδηγήσουν σε βιοαναλυτικά σφάλματα. Αυτά τα ζητήματα περιλαμβάνουν, χωρίς να περιορίζονται, στην έλλειψη σταθερότητας των αναλυτών, στη διαδικασία κατεργασίας των δειγμάτων, στην επίδραση του μητρικού υλικού ή /και αλληλεπιδράσεις ειδικού πληθυσμού, στη λανθασμένη επισήμανση των δειγμάτων, στην ανεπαρκή χρωματογραφική ειδικότητα και στη μη ομοιογένεια των δειγμάτων.
Συμπερασματικά, η αξιολόγηση των προαναφερθέντων ζητημάτων μαζί με τις πιθανές λύσεις τους αποκτούν πολύ μεγάλη σημασία στις σύγχρονες βιοαναλυτικές μεθόδους.

Λέξεις-Κλειδιά: Βιοανάλυση, κατευθυντήρια οδηγία, μελέτες βιοϊσοδυναμίας, φασματομετρία μαζών.

Abstract

Incurred sample reanalysis (ISR) is a recent requirement by regulatory agencies to demonstrate reliability of bioanalytical measurements. In order to pass ISR, regulatory recommendations require that 67% of ISR (unknown) samples be within 20% of the average of original and reanalyzed values. A failed ISR requires an investigation to determine why the assay is not performing at the same level during sample analysis as compared to the initial method validation runs. On the other hand, a successful ISR assessment helps to improve confidence in the reliability of data.
Several recent publications have demonstrated that incurred sample reanalysis can reveal various methodological and/or operational issues that may lead to bioanalytical errors. These issues include, but are not limited to, instability of the analyte(s) of interest,

suboptimal sample preparation procedures, population specific matrix effect and/or interference, inadvertent sample switching, inadequate chromatographic selectivity and sample nonhomogeneity.
Therefore, a consideration of the aforementioned issues along with potential solutions would be very helpful in modern bioanalytical methods.

Keywords: Bioanalysis, guideline, bioequivalence studies, mass spectrometry.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επαναληπτική ανάλυση μετρηθέντων δειγμάτων είναι ένα σημαντικό βήμα στην τρέχουσα πρακτική της βιοανάλυσης με LC-MS/MS. Ένας αριθμός δειγμάτων που ελήφθησαν από μία τυπική *in vivo* μελέτη αναλύονται για δεύτερη φορά, με τη χρήση της επικυρωμένης μεθόδου, σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες του EMA (2009) και του FDA (2013).
Ο σκοπός της διεξαγωγής του ISR είναι να αξιολογηθεί η αναπαραγωγιμότητα μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού και η ακεραιότητα της βιοαναλυτικής διαδικασία και τελικά, τα λαμβανόμενα βιοαναλυτικά αποτελέσματα (Booth 2011, Fast 2009, Viswanathan 2007). Αρκετές πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν δείξει ότι ο έλεγχος ISR μπορεί να αποκαλύψει διάφορα μεθοδολογικά ή/και ζητήματα χειρισμών που μπορεί να οδηγήσουν σε βιοαναλυτικά σφάλματα (Dicaire 2011, Fu 2011, Meng 2011, Rocci 2011, Tan 2011, Yadav 2011).
Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα σημαντικότερα αίτια ύπαρξης αποτυχιών κατά τον έλεγχο του ISR, καθώς και οι προτεινόμενες λύσεις για την αποτελεσματική πρόληψη-αντιμετώπισή τους

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα τελευταία χρόνια η συστηματική χρήση του LC-MS/MS στη βιοανάλυση σε κλινικές, προκλινικές και τοξικολογικές μελέτες αποκάλυψε ένα σημαντικό πρόβλημα, που απαντάται σε αυτές τις μελέτες: αυτό της αποτυχίας κατά τον έλεγχο της επαναληπτικής ανάλυσης. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αποκλίσεις έως και 300% μεταξύ των αρχικών και των επαναληπτικών μετρήσεων των ίδιων δειγμάτων. Το παραπάνω οδήγησε τις αρχές στην θέσπιση προδιαγραφών για την αποδοχή μίας τέτοιας μελέτης, ακόμη και αν η μέθοδος έχει επικυρωθεί όπως προβλέπεται.
Η επικύρωση από μόνη της δεν είναι αρκετή για να εγγυηθεί την αξιοπιστία της μεθόδου, καθώς τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου (QCs) δεν μπορούν να μιμηθούν τα πραγματικά δείγματα για τους ακόλουθους λόγους:
Α) στα πραγματικά δείγματα είναι δυνατόν να είναι πολύ διαφοροποιημένα τα επίπεδα κάποιων ενδογενών ουσιών, λόγω ασθένειας ή ειδικών διατροφικών συνηθειών
Β) στα πραγματικά δείγματα μπορεί να υπάρχουν και άλλα μόρια, όπως φάρμακα που μπορεί να επηρεάζουν την ανάλυση.
Ο έλεγχος ISR γίνεται στο 10% των δειγμάτων αν ο συνολικός τους αριθμός είναι < 1000 και στο 5% των πραγματικών δειγμάτων αν αν ο συνολικός τους αριθμός είναι > 1000. Συνιστάται η χρήση δειγμάτων γύρω από την περιοχή Cmax και στη φάση απομάκρυνσης του φαρμάκου από τον οργανισμό. Ως αποδεκτός, θεωρείται ο έλεγχος ISR όταν η %

διαφορά μεταξύ των 2 μετρήσεων είναι ≤ 20% της μέσης τιμής τους για ≥ 67% των δειγμάτων. Ειδικά για την περίπτωση των ανοσοπροσδιορισμών, λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους, το όριο αποδοχής επεκτείνεται στο 30%.
Πέρα από τις απαιτήσεις για το ISR, ακόμη και στην περίπτωση που ο έλεγχος είναι επιτυχής, κάποιες μετρήσεις με ασυνήθιστα μεγάλη απόκλιση που μπορεί να δείχνουν μία τάση, χρήζουν διερεύνησης για την αποκάλυψη κάποιου κρυμμένου προβλήματος και τη συνακόλουθη λήψη των διορθωτικών ενεργειών.
Όσον αφορά τους λόγους για την αποτυχία στον έλεγχο του ISR αυτοί εντοπίζονται κυρίως:
I) Σε ζητήματα σταθερότητας, με μετατροπή του μεταβολίτη στο μητρικό μόριο ή το αντίστροφο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης
II) Σε ζητήματα σταθερότητας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης
III) Σε ανομοιογένεια του δείγματος, ειδικά αν ο όγκος του είναι ελλιπής. Στην περίπτωση αυτή ανήκουν και οι ξηραμένες κηλίδες βιολογικού υλικού (αίμα, πλάσμα κτλ) επί χάρτου.
IV) Σε φαινόμενα επίδρασης του μητρικού υλικού, με ενίσχυση ή καταστολή του σήματος, ειδικά για αναλύσεις με LC-MS/MS
V) Σε ποικίλη ανάκτηση από τα βιολογικά υλικά, ειδικά για ειδικές κατηγορίες του πληθυσμού
VI) Σε ανθρώπινο σφάλμα, λόγω λάθους στην ανάγνωση των ετικετών ή στη λήψη διαφορετικών όγκων

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το European Bioanalysis Forum (EBF) σε σχετικά πρόσφατο συνέδριο κατέληξε σε μία σειρά συμπερασμάτων και προτάσεων για την αντιμετώπιση του φαινομένου. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το είδος των μελετών, ο έλεγχος ISR δεν φαίνεται να είναι σημαντικός για προκλινικές μελέτες. Είναι όμως εκ των ων ουκ άνευ για κάθε σημαντική αλλαγή της μεθόδου. Ως δείγματα προς ανάλυση δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνενωμένα (pooled) δείγματα, αλλά αυτούσια, χωρίς να αποκλείεται η δυνατότητα της αραίωσης για δείγματα με ευρεθείσα συγκέντρωση > ULOQ. Η ανάλυση γίνεται με μονή μέτρηση, χωρίς επαναλήψεις και υπολογισμό μέσης τιμής. Επαναβεβαιώθηκαν τα ανεκτικότερα όρια για τις ανοσομεθόδους και συνομολογήθηκε η πολύ μεγαλύτερη εμπειρία-γνώση για το φαινόμενο σε μικρά μόρια. Επιπλέον, τονίστηκε η αυξημένη προσοχή που απαιτείται κατά την ποσοτικοποίηση δειγμάτων από ειδικά τμήματα του πληθυσμού, όπως ασθενείς με νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια, ηλικιωμένους, παιδιά κτλ). Τέλος, όσον αφορά την ένταξη των αποτελεσμάτων του ελέγχου ISR, αυτή μπορεί να γίνει είτε στο κομμάτι της επικύρωσης (προτιμητέο) ή μαζί με την ανάλυση των αγνώστων.
Για την αποφυγή των αποτυχιών κατά τον έλεγχο ISR συνιστάται ανά περίπτωση:
Α) Για ζητήματα σταθερότητας: Η πολύ καλή βιβλιογραφική αναζήτηση πριν την έναρξη των πειραμάτων για την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου είναι απαραίτητη. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται και στη σταθερότητα των μεταβολιτών. Μπορεί να απαιτηθεί η διενέργεια της εκχύλισης σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία ή η αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη στους -75 ^{o}C (π.χ. σιμβαστατίνη). Ακόμη και η περίπτωση προσθήκης συντηρητικού δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Β) Για ζητήματα εκλεκτικότητας: Η παρουσία ενός ισοβαρούς μεταβολίτη μπορεί να παρεμποδίζει την ανάλυση. Σε τέτοια περίπτωση είναι απαραίτητος ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η αλλαγή των παρακολουθούμενων θραυσμάτων στη φασματομετρία μαζών.
Γ) Σε φαινόμενα επίδρασης μητρικού υλικού: Ποτέ δεν θεωρείται αρκετή μία ανάλυση για τη μελέτη αυτού του φαινομένου. Ωστόσο, φαίνεται πως ένας αριθμός 6-10 παρτίδων υλικού είναι ικανοποιητικός, χρησιμοποιώντας βιολογικό δείγμα και από τα 2 φύλλα. Επίσης, επιβάλλεται ο έλεγχος σε δείγματα υπερλιπιδαιμικά ή αιμολυμένα. Τέλος, έστω δειγματοληπτικά πρέπει να γίνεται έλεγχος για πολύ αργά εμφανιζόμενες κορυφές, ακόμα και 5 φορές το χρόνο ανάλυσης. Αν παρατηρηθεί τέτοιο πρόβλημα, η χρήση ενός προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης για την ταχεία απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών.
Δ) Σε περιπτώσεις μετατροπής πάνω στη στήλη: Σε αυτή την περίπτωση, ίσως και να αρκεί η αντικατάσταση της μεθανόλης από το ακετονιτρίλιο (περίπτωση κλοπιδογρέλης) ως οργανικού τροποποιητή.
Ε) Σε ανομοιογενή δείγματα, αυτό που επιβάλλεται είναι η πολύ καλή ανακίνησή τους. Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται το υπερβολικό γέμισμα των φιαλιδίων με δείγμα, γιατί δυσχεραίνεται η ανάδευση του περιεχομένου. Στην ειδική περίπτωση των ξηραμένων κηλίδων βιολογικού υγρού επί χάρτου, η τοποθέτηση πρέπει να γίνεται από έμπειρο χρήστη σε χαρτί που έχει ελεγχθεί προγενέστερα.
ΣΤ) Σε περιπτώσεις μεγάλων διακυμάνσεων του εσωτερικού προτύπου, το εργαστήριο πρέπει να έχει προβλέψει το φαινόμενο θέτοντας όρια π.χ. 50-150% της μέσης τιμής σήματος (π.χ. εμβαδού) του εσωτερικού προτύπου ή διενεργώντας ανάλυση τάσεων (trend analysis). Σε κάθε περίπτωση η χρησιμοποίηση ισοτοπικά επισημασμένου αναλύτη είναι η προτεινόμενη λύση.
Συμπερασματικά, ο έλεγχος ISR πρέπει να προβλέπεται σαφώς σε SOP του εργαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων και πιθανών σεναρίων και των τρόπων αντιμετώπισής τους. Απαιτείται πλήρης καταγραφή των ενεργειών και διενέργεια επιπλέον πειραμάτων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Booth B., "*Incurred sample reanalysis*" Bioanalysis, 3, p.p. 927−928, 2011

Dicaire C., Bérubé E.R., Dumont I., Furtado M., Garofolo F., "Impact of oxcarbazepine sulfate metabolite on incurred sample reanalysis and quantification of oxcarbazepine", Bioanalysis 3, p.p. 973−982, 2011.

European Medicines Agency (EMA). *Guideline on validation of bioanalytical methods* (2009). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, accessed 3 February 2016.

Fast D.M., Kelley M., Viswanathan C.T., O'Shaughnessy J., King S.P., Chaudhary A., Weiner R., DeStefano A.J., Tang D., "*Workshop report and follow-up--AAPS Workshop on current topics in GLP bioanalysis: Assay reproducibility for incurred samples--implications of Crystal City recommendations*" AAPS J. 11, p.p. 238−241, 2011

Food & Drug Administration (FDA). *Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation (Draft guidance)* (2013). http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf, accessed 3 February 2016.

Fu Y., Li W., Smith H.T., Tse F.L., "*An investigation of incurred human urine sample reanalysis failure*", Bioanalysis 3, p.p. 967− 972, 2011.

Meng M., Reuschel S., Bennett P., "*Identifying trends and developing solutions for incurred sample reanalysis failure investigations in a bioanalytical CRO*" Bioanalysis 3, p.p. 449−465, 2011.

Rocci M.L. Jr, Collins E., Wagner-Caruso K.E., Gibbs A.D., Fellows D.G., "*Investigation and resolution of incurred sample reanalysis failures: two case studies*" Bioanalysis 3, p.p. 993−1000, 2011.

Tan A., Gagnon-Carignan S., Lachance S., Boudreau N., Lévesque A., Massé R, "Beyond successful ISR: case-by-case investigations for unmatched reassay results when ISR passed", Bioanalysis 3, p.p. 1031−1038, 2011.

Viswanathan C.T., Bansa, S., Booth B., DeStefano A.J., Rose M.J., Sailstad J., Shah V.P., Skelly J.P.. Swann P.G., Weiner R., "*Workshop/Conference Report - Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays*" AAPS J. 9, p.p. E30−E42, 2007.

Yadav M., Shrivastav P.S., "*Incurred sample reanalysis (ISR): a decisive tool in bioanalytical research*" Bioanalysis 3, p.p. 1007−1024, 2011.