

Вниманию читателей предлагается окончание серии статей, в которых рассмотрены вопросы создания метрологического комплекса для аттестации существующих и вновь разрабатываемых экспресс-тестов на базе квантовых точек и иммунохроматографических тест-систем. Начало см. «Метрология» № 10, 2012 г.

57.083.3:543.544:006.091

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ РИСКОВ ЛОЖНОГО СРАБАТЫВАНИЯ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

**С. С. ГОЛУБЕВ, М. В. ЗЕЛЕНКОВА, Я. А. КОРОЛЕНКО, Ю. А. КУДЕЯРОВ,
Д. А. ФИЛИМОНОВ**

*Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы,
Москва, Россия, e-mail: kudeyarov@vniims.ru*

Рассмотрены методы, основанные на вычислении условных вероятностей, с помощью которых оцениваются вероятности ошибок 1-го и 2-го рода при иммунохроматографическом анализе. Приведены методы оценки подобных ошибок: аналитический, численный и основанный на рассмотрении метода калибровочных кривых. Получен график зависимости вероятности ложного срабатывания от концентрации анализируемого вещества.

Ключевые слова: *риски ложного срабатывания, ложноположительный и ложноотрицательный результаты, ошибки 1-го и 2-го рода.*

The methods based on conditional probabilities calculation used for estimation of the first and the second type of immunochromatographic analysis error are described. The three methods of such errors estimation are presented: the analytical, the numerical and the one based on consideration of calibration curves method. The graph of misoperation probability dependence from the analysed substance concentration was received.

Key words: *false result risks, false-positive result, false-negative result, first and second type errors.*

Иммунохроматографические экспресс-тесты являются успешным примером применения нанотехнологической продукции. Механизм их действия основан на взаимодействии между объектами (макромолекулами, антителами и т. п.) с характерным размером частиц менее 100 нм. В последние годы они стали одним из основных инструментов в различных областях медицинской диагностики, контроля качества продукции и оценки загрязнения окружающей среды. Причиной такой популярности является их доступность, оперативность и отсутствие жестких требований к квалификации оператора. Зачастую исследуемый образец может быть нанесен на тест-полоску без длительной предварительной пробоподготовки, при этом результат тестирования может быть оценен визуально без использования дополнительного оборудования.

Тем не менее, данный метод не лишен недостатков. До последнего времени они были связаны с невозможностью автоматизированного получения документации, субъективной интерпретацией результатов тестирования и отсутствием количественных оценок. В последнее время ситуация несколько улучшилась благодаря появлению основанных на новых технологиях тест-систем и автоматизированных приборов регистрации выходных сигналов. Очевидно, что массовое внедрение в производство и применение рассматриваемых систем должно предварять исследование возможностей использования иммунохроматографического подхода для достижения не только качественных, но и количественных результатов анализа. Некоторые результаты такого рода исследований приведены в работах [1, 2] и методиках измерений [3, 4].

Следует отметить, что вне зависимости от типа теста (качественный или количественный) основным его назначением является определение наличия или отсутствия вещества в пробе. Из-за несовершенства тест-систем (дефекты технологии изготовления тестовых полосок, погрешности средств измерений (ридера), используемых для измерения интенсивности свечения маркеров в исследуемом веществе, разведения проб, служащих для построения калибровочных кривых (КК) (градуировочных характеристик), определения концентрации с помощью КК) всегда имеется вероятность принятия неверного решения по результатам анализа.

Таким образом, использование иммунохроматографических тест-систем для определения наличия и измерения концентрации веществ

в пробах всегда сопровождается риском их возможного ложного срабатывания. Количественной мерой служит вероятность этого срабатывания. Рассмотрим более подробно методы, основанные на вычислении соответствующих вероятностей, с помощью которых проводится оценка рисков ложного срабатывания таких тест-систем.

Под риском ложного срабатывания понимается вероятность, с которой результат определения концентрации антигена в пробе может быть как ложноположительным, так и ложноотрицательным.

Ложноположительный результат (ошибка 1-го рода) указывает на присутствие вещества в пробе, в то время как его реальная концентрация меньше критического уровня, а ложноотрицательный (ошибка 2-го рода) – показывает на отсутствие вещества в пробе, в то время как его концентрация превышает критический уровень.

В свою очередь, под критическим уровнем понимается максимально допустимая концентрация вещества в пробе. Считается, что при концентрации антигена в веществе меньше критического антиген реально отсутствует, а при концентрации выше критической – присутствует.

Перечень ситуаций, которые можно трактовать как ошибки первого и второго родов при иммунном анализе, приведен в таблице.

Значение вероятности рисков ложного срабатывания во многом определяется параметрами КК и зависит от многих факторов.

Подходы к решению рассматриваемой задачи и некоторые полученные результаты ее решения приведены в разработанной авторами методике измерений [5], структура и содержание которой соответствуют требованиям [6].

Методика [5] основана на результатах экспериментальных измерений светимости тест-полосок при известных концентрациях анализи-

Возможные ситуации и характер ошибок 1-го и 2-го рода

Истинная ситуация	Результат тестирования	Характер ошибки
Определяемое вещество в пробе отсутствует	отрицательный	Ошибка отсутствует
Определяемое вещество в пробе отсутствует	положительный	Ошибка 1-го рода (ложноположительный результат)
Определяемое вещество в пробе присутствует	отрицательный	Ошибка 2-го рода (ложноотрицательный результат)
Определяемое вещество в пробе присутствует	положительный	Ошибка отсутствует

руемого вещества, необходимых для определения КК конкретных типов тест-полосок, на методиках построения КК [3, 4] и других нормативных документах, а также на методах математической статистики, позволяющих проводить оценку рисков ложного срабатывания. При этом следует отметить, что при разработке методов оценки рисков ложного срабатывания в распоряжении авторов полностью отсутствовала какая-либо предварительная статистика, а также нормативные требования к допустимому уровню рисков таких срабатываний.

Исходя из КК, при построении которых измеряемой величиной является коэффициент светового отражения (КСО) аналитической зоны тестовой полоски и, в конечном итоге, светимость этой полоски, нельзя гарантировать точные результаты анализа проб с неизвестными концентрациями. Всегда имеют место риски совершения ошибок 1-го или 2-го рода. И если для ситуаций, связанных с возможностями совершения ошибок 2-го рода, иногда имеется априорная информация, способствующая исключению таких ошибок (поведенческие и медицинские факторы), то в случае возможного проявления ошибок 1-го рода она отсутствует.

Вероятность совершения ошибок 1-го и 2-го рода повышается по мере приближения значения светимости к критическому порогу, под которым понимается светимость, отвечающая критической концентрации. Более того, можно показать, что при критическом значении концентрации вероятности совершения ошибок 1-го и 2-го рода сравниваются и достигают максимального уровня равного 0,5.

В отличие от качественных, количественные тест-системы позволяют оценить близость результата оценки концентрации к критическому значению, поэтому в данной работе и в методике измерений [5] основное внимание уделено количественным тест-системам.

При оценке рисков (рис. 1) ложного срабатывания и выделения областей, в которых возможно ложное срабатывание, необходимо обратить внимание на то, что на самом деле значения светимости, служащие для построения КК методом наименьших квадратов (МНК), измеряются с погрешностью, значения которой для конкурентного метода тестирования в области малых концентраций могут быть значительными (порядка среднеквадратического отклонения (СКО) и более).

При оценке рисков ложного срабатывания в каждой точке k ($k = 1, 2, \dots, m$, где m – число стандартных разведений анализируемого

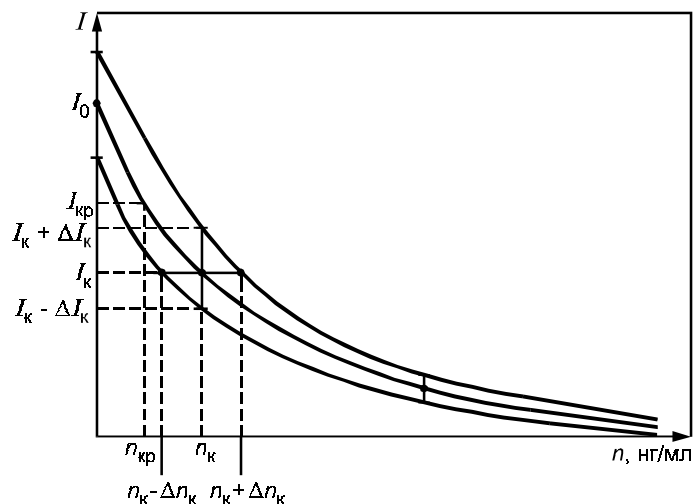


Рис. 1. График зависимости погрешности измерения концентрации от погрешности измерения светимости в методе калибровочных кривых (на примере обратной зависимости)

вещества) измеренного значения светимости $\bar{I}_k$ (среднего значения светимости по результатам многократных измерений) откладываются по оси светимости в обе стороны от среднего значения отрезки длиной ΔI_k (погрешность измерения светимости при k -м стандартном разведении). В результате получаем три набора точек: средние значения светимости $\bar{I}_k$, верхние и нижние оценки светимости $\bar{I}_k + \Delta I_k$, $\bar{I}_k - \Delta I_k$. Как известно [3], по средним значениям светимости с помощью МНК строится КК. Что же касается наборов точек, соответствующих верхним и нижним оценкам светимости, то для них посредством МНК строятся аналогичные кривые. Особенность построения этих кривых сводится к аппроксимации МНК полученных ранее значений погрешности зависимостями, используемыми при построении КК, а затем к откладыванию значений ΔI_k в нужных точках вверх и вниз от КК. Таким образом, получаются три кривые, рассчитанные по трем указанным наборам точек: КК, рассчитанная по средним значениям светимости по МНК, верхняя и нижняя характеристики. Соответствующие графики представлены на рис. 2, при этом КК строятся в предположении, что они могут быть описаны функциями:

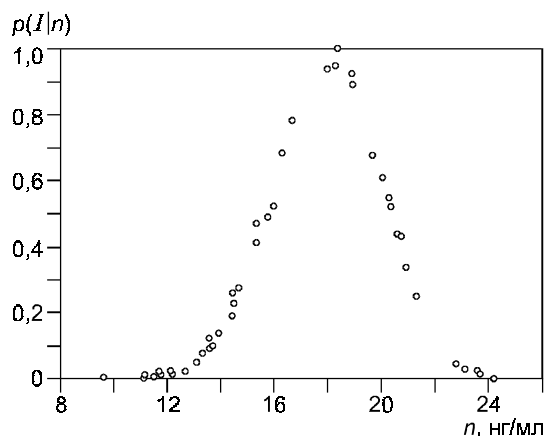


Рис. 2. Распределение функции плотности условной вероятности концентрации, найденное численным методом (обратная зависимость для стандартных разведений бензодиазепина)

в случае прямой зависимости (сэндвич-анализ)

$$I(n) = A(1 - e^{-Bn}). \quad (1)$$

В случае обратной зависимости (конкурентный анализ)

$$I(n) = Ae^{-Bn} + C, \quad (2)$$

где $I(n)$ – КК, описывающая зависимость сигнала от концентрации n , построенная по средним значениям светимости $\bar{I}_k$; A , B , C – численные коэффициенты, рассчитанные в соответствии с методикой измерений [3].

Из рис. 1, представляющего обратную зависимость, следует, что разброс измеренных значений светимости при заданной концентрации n_k в пределах интервала $2\Delta I_k$, определяемого погрешностью измерений светимости, приводит к погрешности измерения концентрации по калибровочной кривой, равной интервалу $2\Delta n_k$.

Предположим, что концентрация анализируемого вещества в пробе $n < n_{кр}$. Это значит, что измеренное с помощью КК значение концентрации n_k будет также находиться левее критической концентрации $n_{кр}$, и на этом основании будет принято решение об отсутствии вещества в пробе. Но поскольку концентрация измеряется с погрешностью, границы которой определяются интервалом $[n_k - \Delta n_k, n_k + \Delta n_k]$, при

некоторых условиях может получиться так, что часть этого интервала $[n_{кр}, n_k + \Delta n_k]$ будет находиться правее критической концентрации, и измеренное значение концентрации с определенной вероятностью может оказаться в этой части интервала. Если на основании такого измерения принимается решение о присутствии вещества в пробе, в то время как оно реально отсутствует, то будет совершена ошибка 1-го рода (см. таблицу). Вероятность попадания измеренного значения концентрации в интервал $[n_{кр}, n_k + \Delta n_k]$ пропорциональна его длине, другими словами, и вероятность совершения ошибки 1-го рода пропорциональна длине этого интервала (это утверждение справедливо в том случае, когда функция распределения плотности вероятности для концентрации является равномерной).

В противоположном случае, когда анализируемое вещество в пробе заведомо присутствует, т.е. $n > n_{кр}$, полученная по КК концентрация n_k должна находиться правее критической концентрации $n_{кр}$. Наличие погрешности измерения концентрации, как и в предыдущем случае, может привести к попаданию измеренного значения в интервал $[n_k - \Delta n_k, n_{кр}]$, на основании чего возможно решение об отсутствии анализируемого вещества в пробе, в то время как оно на самом деле присутствует, т.е. будет совершена ошибка 2-го рода. Следовательно, для оценки рисков ложного срабатывания необходимо оценить вероятности попадания измеренных значений концентрации в указанные интервалы.

В дальнейшем предположим, что погрешности измерений, о которых говорилось ранее, являются случайными.

Для оценки вероятностей ложного срабатывания в общем случае необходимо знать функцию распределения плотности вероятности концентрации при определенном значении светимости, т.е. светимость и концентрация должны рассматриваться как зависимые случайные величины. При этом функция распределения плотности вероятности для интенсивности свечения при заданной концентрации с большой точностью может выглядеть как нормальная, что подтверждено экспериментальными результатами. В то же время функция распределения плотности вероятности (в дальнейшем плотность вероятности) для концентрации при заданной интенсивности свечения в общем случае отличается от нормальной, т.к. значения концентраций получаются из значений светимости с применением нелинейных преобразований, обратных преобразованиям (1), (2).

Для оценки вероятности ошибок 1-го и 2-го рода необходимо выбрать соответствующие гипотезы и критерии принятия или непринятия нулевой гипотезы. В случае экспресс-тестов гипотезы выбираются следующим образом:

гипотеза H_0 (нулевая) – вещество не содержится в исследуемом образце (содержится в концентрации меньше критической);

гипотеза H_1 – вещество в исследуемом образце содержится в концентрации больше критической.

Реализация критерия принятия гипотезы в случае использования КК сводится к следующему:

с помощью микроанализатора экспериментально измеряется светимость $I(n)$ как функция стандартных разведений, т. е. определяется набор точек $\bar{I}_k(n_k)$, принадлежащих этой функциональной зависимости;

с использованием полученных экспериментальных данных по методике [3] строится КК, по которой в дальнейшем определяется значение концентрации n анализируемого вещества в пробе;

если полученное значение меньше критического $n_{кр}$, то принимается гипотеза H_0 , в противном случае принимается конкурирующая гипотеза H_1 .

Оценка вероятностей ошибок 1-го и 2-го рода основана на определении плотности распределения условной вероятности $p(n | I = I_k)$ для концентрации определяемого вещества при светимости I_k аналитической зоны тест-полоски. Отметим, что I_k отвечает любому значению светимости, соответствующему k -му измерению концентрации анализируемого вещества, в том числе и среднему значению по многократным измерениям.

Как уже говорилось, концентрация и светимость рассматриваются как зависимые случайные величины с плотностью вероятности совместного распределения двух случайных величин $p(n, I)$.

Плотность распределения условной вероятности для концентрации определяемого вещества при заданной светимости тест-полоски может быть записана в виде

$$p(n | I = I_k) = \frac{p(I | n)p(n)}{\int_{-\infty}^{+\infty} p(I | n)p(n)dn} \Bigg|_{I=I_k}, \quad (3)$$

где $p(I | n)$ – плотность распределения условной вероятности светимости при заданной концентрации n , имеющая нормальный закон распределения

$$p(I | n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma(n)} e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}, \quad (4)$$

где $p(n)$ – плотность распределения вероятности концентрации; $\bar{I}(n)$ – среднее значение светимости (математическое ожидание) по результатам многократных измерений, выполненных на наборе тест-полосок одного типа; $\sigma^2(n)$ – дисперсия (разброс) значений светимости относительно среднего значения, являющаяся в общем случае функцией концентрации n (неравноточные измерения).

Для вычисления интересующей нас плотности распределения вероятности $p(n | I = I_k)$, определяемой с помощью (3), необходимо знать плотность распределения вероятности концентрации $p(n)$, так как плотность вероятности $p(I | n)$ известна из (4).

В данной работе распределение вероятности $p(n)$ предполагается равномерным во всей области ее определения ввиду отсутствия какой-либо априорной информации о ней.

Это означает, что для прямой зависимости

$$p(n) = \begin{cases} 1/(n_{\max} - n_{\pi}), & \text{если } n \text{ принадлежит области определения;} \\ 0, & \text{если } n \text{ не принадлежит области определения;} \end{cases}$$

для обратной зависимости

$$p(n) = \begin{cases} 1/n_{\pi}, & \text{если } n \text{ принадлежит области определения;} \\ 0, & \text{если } n \text{ не принадлежит области определения,} \end{cases}$$

где $n_{\max}$ – максимально возможная по медицинским и биологическим основаниям концентрация анализируемого вещества в пробе; n_{π} – пороговый уровень концентрации, начиная с которого начинает наблюдаться сигнал светимости при прямой зависимости и, начиная с которого, перестает наблюдаться сигнал светимости при обратной зависимости.

Это в свою очередь означает, что интегрирование в знаменателе (3) должно проводиться не от $-\infty$ до $+\infty$, а в интервале $[n_{\pi}, n_{\max}]$ для прямой зависимости и $[0, n_{\pi}]$ – для обратной.

При оценке рисков ложного срабатывания как вероятности попадания измеренных концентраций в те части интервалов, где возможно возникновение ошибок 1-го и 2-го рода, необходимо в соответствии с (3) вычислить площадь под функцией распределения плотности вероятности для светимости на интервале концентраций, где возможна ошибка контроля.

Исходя из этих соображений, оценку рисков ложного срабатывания можно провести следующим образом:

для прямой зависимости

$$P_{\alpha}(n) = \int_{n_{кр}}^{n_k + \Delta n_k} p(n | I = I_k) dn = \frac{\int_{n_{кр}}^{n_k + \Delta n_k} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn}{\int_{n_{п}}^{n_{\max}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)} ; \quad (5)$$

$$P_{\beta}(n) = \int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{кр}} p(n | I = I_k) dn = \frac{\int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{кр}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn}{\int_{n_{п}}^{n_{\max}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)} , \quad (6)$$

где $P_{\alpha}(n)$, $P_{\beta}(n)$ – вероятности ошибок 1-го и 2-го рода; $I(n) = \bar{I}(n_k)$ – калибровочная кривая, построенная по средним значениям светимости, которая для прямой зависимости (сэндвич-анализ) имеет вид $I(n) = A(1 - e^{-Bn})$.

$$P_{\alpha}(n) = \int_{n_{\text{кр}}}^{n_k + \Delta n_k} p(n | I = I_k) dn =$$

$$= \frac{\int_{n_{\text{кр}}}^{n_k + \Delta n_k} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn}{\int_0^{n_{\text{п}}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}; \quad (7)$$

$$P_{\beta}(n) = \int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{\text{кр}}} p(n | I = I_k) dn =$$

$$= \frac{\int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{\text{кр}}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn}{\int_0^{n_{\text{п}}} \left[e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}} / \sigma(n) \right] dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}, \quad (8)$$

где $I(n) = \bar{I}(n_k)$ – калибровочная кривая, построенная по средним значениям светимости, которая для обратной зависимости (конкурентный метод) имеет вид $I(n) = Ae^{-Bn} + C$.

Для проведения численных оценок с помощью (5) – (8) необходимо знать в явном виде функциональные зависимости $\bar{I}(n)$, $\sigma^2(n)$.

Что касается $\bar{I}(n)$, то ее значения при стандартных разведениях n_k известны из эксперимента по построению КК, а значения при других концентрациях определяются по КК. Значения $\sigma(n)$ получаются из аппроксимационных кривых, используемых при построении верхней и нижней характеристик, о которых говорилось ранее.

Иной подход к проведению численных оценок основан на известном в метрологии методе обработки неравноточных измерений [7], использующем с помощью экспериментальных данных вычисления весовых коэффициентов и определение средневзвешенных среднего значения и дисперсии. Этот подход в данной работе не рассматривался.

Таким образом, в (5) – (8) все переменные и параметры известны из эксперимента и аппроксимационных зависимостей, что позволяет графически построить зависимость вероятностей рисков ложного срабатывания от измеренных с помощью КК значений концентрации (рис. 3).

При вычислении плотности вероятности $p(n | I = I_k)$ также можно использовать численный метод расчета.

Исходными данными для такого расчета являются КК и уже упоминавшиеся верхняя и нижняя характеристики, поскольку они определяют как распределение плотности вероятности, так и погрешность измерения концентрации. Для численного нахождения распределения плотности вероятности концентрации на примере обратной зависимости (конкурентного метода), полученной при измерении светимости тестовых полосок, вызванной присутствием бензодиазепина в пробе, выполняется следующая последовательность действий.

1. Интервал концентраций разбивается на N равных отрезков. Каждому левому концу отрезка на КК соответствует значение концентрации n_k и светимости I_k . С помощью верхней и нижней характеристик определяются два интервала: $[I_k - \Delta I_k, I_k + \Delta I_k]$, отвечающий

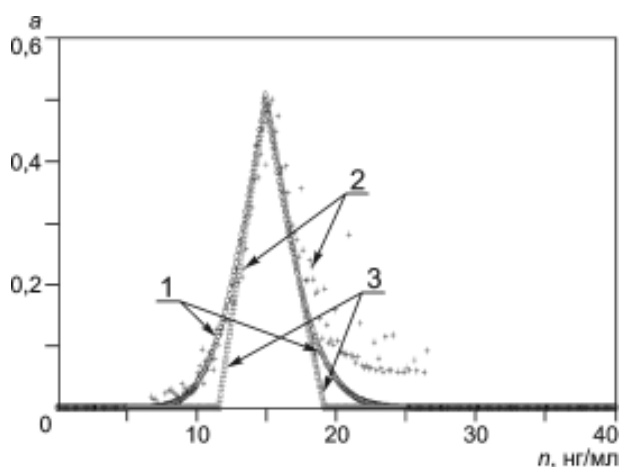


Рис. 3. Зависимость рисков ложного срабатывания тест-систем от концентрации, измеренной методом калибровочных кривых (обратная зависимость для стандартных разведений бензодиазепина):

1, 2 – аналитический и численный методы; 3 – метод косвенных измерений

длины. Обратим внимание на то, что каждому значению светимости в полученном массиве отвечает определенное значение концентрации. Это значит, что суммарному числу значений светимости, полученному выше, отвечает суммарное значение (частота появления) концентрации, которое необходимо поставить в соответствие какому-то значению концентрации. Это можно сделать разными способами. В данном случае вычислялось среднее значение для каждого выделенного интервала, например $(I_{I_2} + I_{I_3})/2$, по КК определялось соответствующее значение концентрации, и ей ставилось в соответствие суммарное значение (частота появления) концентрации, найденное описанным выше образом. Подобная процедура выполнялась для каждого интервала разбиения оси светимости на равные интервалы. В результате было получено искомое распределение плотности вероятности $p(n | I = I_k)$, график которого приведен на рис. 2.

Знание распределения плотности вероятности концентрации позволяет с помощью (3) оценить вероятности ошибок 1-го и 2-го родов. С этой целью массив данных по распределению плотности вероятности, найденный в предыдущем пункте, ранжируется по возрастанию концентраций, т.е. данные располагаются следующим образом

$$[n_1; p_1], [n_2; p_2], \dots, [n_j; p_j], \dots, [n_N; p_N], \quad (11)$$

где $n_1 < n_2 < \dots < n_j < \dots < n_N$, p_j – частота появления значений концентраций n_j , рассчитанных по п. 2. В массиве (11) интервалу концентраций $\Delta n_j = n_{j+1} - n_j$ будет соответствовать частота появления p_j в этом интервале j -го значения концентрации.

Ошибка 1-го рода возникает в том случае, когда часть значений концентрации будет больше критического значения, в то время как максимальная частота появления концентрации $p_{\max}$ – меньше критической. В этом случае для прямой зависимости формула для нахождения вероятности ошибки 1-го рода определяется выражением

$$P_\alpha = \frac{\sum_{n_{\text{кр}} \leq n_j \leq n_k + \Delta n_k} \Delta n_j p_j}{\sum_{n_{\text{ц}} \leq n_j \leq n_{\text{max}}} \Delta n_j p_j}, \quad j = 1, \dots, N - 1; \quad (12)$$

для вероятности ошибки 2-го рода

$$P_{\beta} = \frac{\sum_{n_k - \Delta n_k \leq n_j \leq n_{кр}} \Delta n_j p_j}{\sum_{n_n \leq n_j \leq n_{max}} \Delta n_j p_j}, \quad j = 1, \dots, N-1. \quad (13)$$

Для обратной зависимости вероятность ошибки 1-го рода

$$P_{\alpha} = \sum_{n_{кр} \leq n_j \leq n_k + \Delta n_k} \Delta n_j p_j / \sum_{0 \leq n_j \leq n_{max}} \Delta n_j p_j, \quad j = 1, \dots, N-1; \quad (14)$$

вероятность ошибки 2-го рода

$$P_{\beta} = \sum_{n_k - \Delta n_k \leq n_j \leq n_{кр}} \Delta n_j p_j / \sum_{0 \leq n_j \leq n_{max}} \Delta n_j p_j, \quad j = 1, \dots, N-1. \quad (15)$$

По полученным значениям P_{α}, P_{β} строится график зависимости вероятности получения ложных результатов анализа от концентрации. На рис. 3 изображен график, полученный по формулам (14), (15) для бензодиаземина.

Следует отметить, что отличие на рис. 3 результатов графического построения по (7), (8) от результатов численного расчета по (14), (15) обусловлено разными методами численной оценки рассмотренных вероятностей.

Вероятности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов измерения концентраций методом КК могут быть также оценены на основе подхода, при котором метод КК рассматривается как метод косвенных измерений.

В самом деле, например, из прямой зависимости (1) получаем следующее выражение для вычисления погрешности измерения концентрации

$$\Delta n = \frac{\Delta B}{B} n + \frac{\Delta A}{AB} + \frac{\Delta I + \Delta A}{(A - \bar{I}(n))B}$$

из обратной зависимости (2)

$$\Delta n = \frac{\Delta B}{B} n + \frac{\Delta I + \Delta C}{B(\bar{I}(n) - C)} + \frac{\Delta A}{AB},$$

где $\Delta A, \Delta B, \Delta C$ – погрешности вычисления коэффициентов аппроксимирующих функций; A, B, C – численные коэффициенты, рассчитанные в соответствии с [3], [4]; ΔI – погрешность измерения светимости тестовой полоски.

В полученных выражениях все величины, стоящие в правых частях, известны из аппроксимационных расчетов и эксперимента. Таким образом, определяется интервал значений концентрации $[n - \Delta n, n + \Delta n]$ относительно «измеренного» по КК значения концентрации n . Поскольку функция распределения плотности вероятности концентрации в общем случае неизвестна, то внутри интервала она предполагается равномерной. Если при этом измеренное значение $n > n_{кр}$, а левый край упомянутого выше интервала попадает в область слева от $n_{кр}$ ($n - \Delta n < n_{кр}$), то возможно получение ложноотрицательного результата анализа. Вероятность ошибки 2-го рода в этом случае будет пропорциональна длине отрезка интервала концентраций, лежащего в области слева от $n_{кр}$, т. е.

$$P_{\beta}(n) = [n_{кр} - (n - \Delta n)] / 2\Delta n. \quad (16)$$

График зависимости вероятности ложноотрицательного результата (ошибки 2-го рода) от концентрации имеет вид линейной зависимости с максимумом, равным 0,5 при $n = n_{кр}$, и минимумом, равным нулю, когда $n - \Delta n = n_{кр}$ (см. рис. 3). Аналогичный вид имеет и график зависимости ложноположительных результатов от определенной по КК концентрации, при этом вероятность ложноположительного результата (ошибки 1-го рода) определяется выражением

$$P_{\alpha}(n) = \frac{[n + \Delta n] - n_{кр}}{2\Delta n}. \quad (17)$$

Оценки вероятностей ошибочных результатов анализа, даваемые (16), (17), справедливы как для прямой, так и для обратной зависимостей концентрации от светимости. Специфика зависимости концентрации от светимости, зависящая от метода иммунного анализа отражается только в форме и параметрах функциональных зависимостей погрешности измерения концентрации от влияющих факторов.

Как уже отмечалось, оценки рисков ложного срабатывания, найденные всеми тремя методами, получены в предположении, что суммарная погрешность измерения концентрации методом КК определяется только случайной составляющей. Графики таких оценок представлены на рис. 3, где часть графика, расположенная левее критического значения относится к вероятности ошибок 1-го рода, правее – к вероятности ошибок 2-го рода.

К сожалению, в реальном эксперименте суммарная погрешность измерения концентрации серьезно осложнена неисключенной систематической составляющей. Наиболее просто учесть влияние систематической составляющей погрешности можно методом, основанным на косвенных измерениях. При этом можно показать, что ширина области концентраций, где возможны ошибочные результаты анализа, равна $2\Delta_L$.

Если обратиться к рис. 3, то можно заметить, что различие в оценках рисков ложного срабатывания, найденных всеми вышеописанными способами невелико: результаты при уровне вероятности 0,1 и более практически совпадают.

Таким образом, количественные тест-системы можно и целесообразно применять для экспресс-диагностики в области медицинских исследований на стадии первичных анализов.

Разработанные методы дают возможность поставить в соответствие каждому единичному результату измерений концентрации риск ложного срабатывания теста, что позволит врачу объективно принять решение о необходимости повторной диагностики.

Предложенные методы оценки рисков ложного срабатывания можно использовать и для других видов функциональных зависимостей, используемых при построении КК.

Для оценки рисков ложного срабатывания тест-систем в случаях, когда систематическая составляющая погрешности пренебрежимо мала по сравнению со случайной, рекомендуется к применению способ, основанный на расчетах по формулам (5) – (8).

Для оценки рисков ложного срабатывания количественных тест-систем при значительной систематической погрешности по сравнению со случайной целесообразно применять метод, основанный на оценке результатов косвенных измерений.

Повышение достоверности оценки рисков ложного срабатывания возможно за счет уменьшения погрешности построения КК, т. е. следует

стремиться к тому, чтобы эта погрешность в основном определялась случайной составляющей, например, за счет снижения методической погрешности приготовления стандартных разведений.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Государственный контракт № 120/170 от 26 мая 2011 г. в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008 – 2011 годы») и Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 16.512.11.2125 от 20 февраля 2011 г. в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы»).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. **Свежова Н. В. и др.** Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. Ч. I. Теоретические основы //Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 1. С. 13 – 22.

2. **Свежова Н. В. и др.** Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. Ч. II. Сравнительная оценка реализованных в различном программном обеспечении математических методов обработки данных ИФА //Там же. С. 23 – 36.

3. **ФР.1.39.2011.11003.** Методика измерений. Определение калибровочных кривых иммунохроматографических тест-систем, включая тест-системы с прямой и обратной зависимостью детектируемого сигнала от концентрации определяемого соединения.

4. **ФР.1.39.2011.11004.** Методика измерений. Определение калибровочных кривых тест-систем на основе квантовых точек, включая системы с прямой и обратной зависимостью детектируемого сигнала от концентрации определяемого соединения.

5. **ФР.1.39.2011.11005.** Методика измерений. Определение рисков ложного срабатывания быстрых тест-систем (на примерах иммунохроматографических тест-систем для различных условий хранения и окружающей среды), включая получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

6. **ГОСТ Р 8.563–2009.** ГСИ. Методики (методы) измерений.

7. **Кузнецов В. А., Исаев Л. К., Шайко И. А.** Метрология. М.: СТАНДАРТ-ИНФОРМ, 2005.

Дата принятия 11.09.2012 г.