

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СИСТЕМ БЫСТРОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

С. С. ГОЛУБЕВ*, Б. Б. ДЗАНТИЕВ, А. В. ЖЕРДЕВ**, С. А. КОНОНОВ*,
Ю. А. КУДЕЯРОВ*, В. О. ПОПОВ****

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

** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

Сформулированы основные задачи, возникающие при разработке комплекса для определения метрологических характеристик иммунохроматографических тест-систем, включая анализ их показателей точности. Утвержден тип используемых средств измерений и созданы методики, позволившие заложить основы получения количественных результатов хроматографических методов иммунных анализов.

Ключевые слова: *тест-системы, моноклональные антитела, квантовые точки, метрологический комплекс, микроанализатор, сканирующие микроскопы, референтная методика.*

The basic tasks of development of complex for immunoassay systems metrological characteristics determination including precision factor analysis are formulated. The type of the used measuring instruments was approved and the procedures allowing to lay the foundations of getting the quantitative results of chromatographic methods of immune analyses were worked out.

Key words: *test systems, monoclonal antibodies, quantum dots, metrological complex, microanalyzer, scanning microscopes, referent methods.*

Большая часть методов медицинской экспресс-диагностики основана на измерении концентраций тех или иных веществ в составе физиологических жидкостей (крови, слюны, мочи и т. д.). По этим данным (например, простат-специфического антигена) судят о необходимости дополнительного обследования пациента, предполагаемой стадии заболевания, необходимости госпитализации и т. п. Широкое применение такой диагностики существенно повышает уровень социального благополучия населения, так как позволяет максимально

оперативно выявить заболевание и начать лечение или принять иные меры медицинского характера.

С другой стороны, системы медицинской экспресс-диагностики представляют собой пример успешной нанотехнологической продукции. В основе их лежит специфическое взаимодействие антиген–антитело, происходящее в нанометровом масштабе. Создание и массовое производство тест-систем, работа которых связана с такими тонкими эффектами, – задача применения нанотехнологий. При этом сложность принципов, лежащих в основе работы этих систем, трансформируется в простоту и доступность их применения пользователем. Следует также отметить весьма невысокую стоимость однократного тестирования при помощи данных методов.

Представленные выше аргументы позволяют с высокой вероятностью говорить о дальнейшем расширении применения систем быстрой медицинской диагностики. Исходя из современного состояния и тенденций их развития можно ожидать, что во многом это будет связано с внедрением в практику систем количественного анализа на основе методов иммунохроматографии. В свою очередь, количественный анализ для получения достоверных результатов остро нуждается в метрологическом обеспечении. Отметим, что разработка метрологического обеспечения для таких систем во всем мире начала развиваться только в последние годы, и необходимо не допустить отставания отечественной нормативной и приборной базы в данной области от мирового уровня.

Основной измеряемой величиной в системах экспресс-тестирования, как отмечалось, является концентрация того или иного биологически активного соединения – фермента, маркера заболевания, гормона и т. д. В большинстве случаев речь идет об органических молекулах с относительной молекулярной массой 1000 и более единиц. Кроме того, ее определение проводится не в чистых растворах (модельных системах), а в различных физиологических жидкостях, где неизбежно присутствуют другие химические соединения сходного строения, часто отличающиеся лишь незначительными фрагментами органические макромолекулы.

Описанная ситуация позволяет сформулировать принципиальное требование к методам определения концентрации для экспресс-диагностики. Они должны обладать очень высокой специфичностью, т. е. позволять измерять концентрацию интересующего соединения на фоне

присутствия в растворе большого количества сходных по молекулярному строению веществ. Метод, не обеспечивающий выполнения данного требования, будет сопровождаться различными сложными процедурами пробоподготовки, что приведет к потере оперативности и к более высоким требованиям к квалификации пользователя, а также увеличит стоимость анализа.

Выше отмечалось, что в основе методов экспресс-диагностики лежит взаимодействие антиген–антитело. Активные исследования в области аналитического применения антител ведутся на протяжении последних пяти десятилетий [1 – 3]. За это время удалось разработать технологии получения моноклональных антител, обладающих очень высокой специфичностью связывания, и получить такие антитела к широкому классу биологически активных веществ. Это позволяет применять иммунохимическую диагностику для подавляющего большинства клинически значимых соединений. Таким образом, использование моноклональных антител в качестве «молекулярных детекторов» на анализируемые вещества позволяет создавать тест-системы для измерения концентраций с необходимым уровнем специфичности.

Рассмотрим методы отображения концентраций, применяемые в системах экспресс-тестирования. Общая схема иммунохроматографической тест-полоски (стрипа) представлена на рис. 1. Идея состоит в проявлении окраски (или, наоборот, в ее отсутствии для тест-систем с обратной зависимостью) так называемой аналитической зоны на полоске экспресс-теста при наличии в анализируемом растворе интересующего соединения. В случае количественной тест-системы о концентрации искомого соединения судят по интенсивности цвета тестовой зоны. Цветность формируется специальными компонентами тест-системы, как правило, это те или иные наноразмерные объекты. Для иммунохроматографических тестов обычно используют частицы коллоидного золота. Большая часть данной работы выполнялась именно на этом виде цветовых маркеров. Однако одним из перспективных направлений развития рассматриваемых систем является использование в качестве таких маркеров нового типа объектов – флуоресцентных наночастиц, так называемых квантовых точек. Они, во-первых, благодаря высокому коэффициенту эмиссии позволяют улучшить светимость тестовой зоны, и, во-вторых, за счет разнообразия цветового спектра квантовых точек позволяют проводить тесты для одновременного

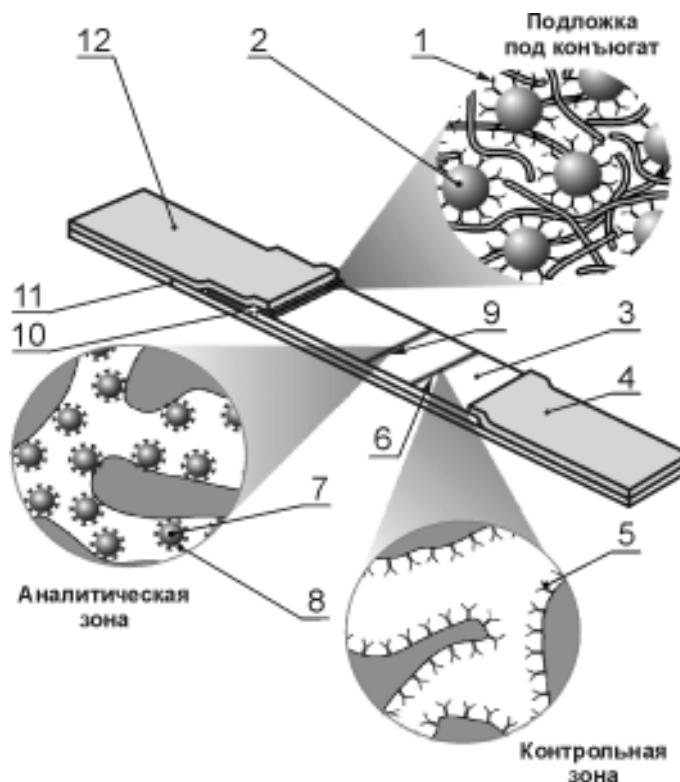


Рис. 1. Общая схема иммунохроматографической тест-полоски:

1 – специфические антитела против хлорамфеникола; 2 – частицы коллоидного золота; 3 – рабочая мембрана; 4 – конечная адсорбирующая мембрана; 5 – анти-видовые антитела; 6, 9 – контрольная и аналитическая зоны; 7 – белок-носитель; 8 – гаптен (антиген); 10 – стекловолоконная мембрана с конъюгатом коллоидного золота и антител; 11 – пластиковая основа; 12 – мембрана, адсорбирующая образец

определения нескольких соединений с индикацией результата различными цветами.

Сформулированные задачи метрологического обеспечения в сочетании с актуальностью проблемы ставят вопрос о создании метрологического комплекса для иммунохроматографических экспресс-тестов, который был разработан 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 (государственный контракт № П423 от 12 мая 2010 г. в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы»). При этом в связи со сложностью объектов и самого процесса измерения концентрации биологически активных соединений ясно, что методическая составляющая рассматриваемого комплекса будет включать большое количество специальных методик измерений, а решение таких новых для отечественной метрологии задач потребует подключения специалистов в области биохимии и иммунологии.

Очевидно, что измерение интенсивности окраски тестовой зоны возможно только с помощью специальных средств измерений (СИ). В настоящей работе в качестве такого СИ использовался анализатор «РЕФЛЕКОМ» определения уровня сигнала (Государственный реестр СИ № 24584-11). С его помощью измеряли интенсивность окрашивания тестовой зоны полоски экспресс-теста в относительных единицах, которую затем с помощью калибровочной кривой пересчитывали в единицы концентрации искомого соединения (рис. 2). В таком

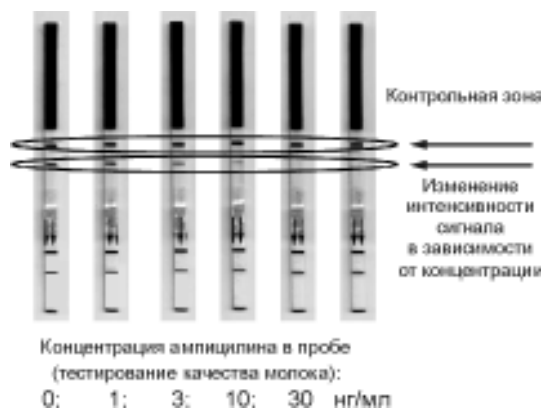


Рис. 2. Сравнение различных концентраций вещества в пробе

определении концентрации заключается основа метода калибровочных кривых.

Одна из задач разрабатываемого метрологического комплекса – установление калибровочных кривых существующих и вновь разрабатываемых тест-систем, включая анализ их показателей точности. Их построение основано на методе наименьших квадратов, с помощью которого вычисляются коэффициенты имеющей экспоненциальный вид теоретической зависимости оптического сигнала от концентрации. Также рассчитываются погрешности коэффициентов, описывающих теоретическую зависимость. Подробнее данная процедура изложена в соответствующих методиках измерений [4, 5].

Комплекс решает задачу метрологического обеспечения систем экспресс-тестов. При этом само обеспечение необходимо как для применения тестов, так и для их производства. Последнее подразумевает решение измерительных задач, связанных с определением размеров и оптических характеристик цветowych маркеров, а также размерных параметров мембранных носителей с разными диаметрами и структурой пор, применяемых в тест-полосках.

Рассмотрим более подробно составляющие созданного метрологического комплекса (рис. 3). Задачи измерения геометрических размеров компонентов нанотехнологической продукции на сегодняшний день достаточно хорошо изучены [6 – 8]. Для их решения в состав комплекса включены сканирующий зондовый микроскоп SmartSPM (Государственный реестр СИ № 3922-08) и просвечивающий электронный микроскоп JEOL (Государственный реестр СИ № 48090-11).

Для построения градуировочных характеристик используется универсальный рефлектометрический анализатор «РЕФЛЕКОМ», позволяющий измерять интенсивность сигнала в тестовой зоне стрипа и обладающий определенной универсальностью по отношению к разным изготовителям тест-полосок. Данное СИ – основное и используется в методиках измерений по определению градуировочных кривых.

Для передачи единицы от эталона к анализатору и его поверки служат специально разработанные меры светового коэффициента отражения МСКО-1 (Государственный реестр СИ № 24585-11). Для калибровки анализаторов пользователей в связи с их специфичностью и многообразием применяются стандартные образцы (СО) светового коэффициента отражения (Государственный реестр СО № 9956-2011). Такой СО также входит в состав метрологического комплекса для



Рис. 3. Метрологический комплекс для существующих и вновь разрабатываемых экспресс-тестов

решения задач поверки (калибровки) рефлектометрических анализаторов пользователей.

В части методической составляющей комплекс включает методики измерений по определению следующих характеристик:

калибровочных кривых экспресс-тестов с прямой и обратной зависимостями сигнала на основе коллоидного золота и квантовых точек;

рисков ложного срабатывания тест-систем;

метрологических характеристик иммунохроматографических тест-систем и тест-систем для одновременного определения содержания нескольких соединений, квантовых точек и реагентов на их основе, тест-систем на базе квантовых точек и квантовых точек для одновременного содержания нескольких соединений.

Кроме того, комплекс содержит пять программ испытаний по определению метрологических характеристик компонентов тест-систем (мембран, квантовых точек, частиц коллоидного золота).

Таким образом, созданный метрологический комплекс позволяет решать проблему метрологического обеспечения быстрых тест-систем как на стадии их производства (контроль за технологическими параметрами компонентов системы), так и применения конечными пользователями (получение градуировочных кривых конкретных тест-систем).

Следует отметить, что рассмотренные методы измерения концентраций биологически активных соединений наряду с достоинствами в виде низкой себестоимости анализа, его высокой скорости и простоты выполнения имеют недостаток – значительную погрешность измерений. Поэтому рассматриваемый комплекс, являющийся по сути калибровочным, нуждается в дополнении в дальнейшем референтной методикой (или методиками), позволяющей привязывать результаты к исходным по точности методам. Это дает возможность создать эталонный комплекс на базе разработанного метрологического. В настоящее время, как следует из мирового опыта, в качестве референтной методики разрабатываются различные варианты рамановской спектроскопии (SERS). На сегодняшний день это направление наиболее перспективно для развития данного метода.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. **Дзантиев Б. Б., Жердев А. В.** Иммуноаналитические методы // Проблемы аналитической химии. Т. 12. Биохимические методы анализа / Под ред. Б. Б. Дзантиева. М.: Наука, 2010.
2. **Егоров А. М. и др.** Теория и практика иммуноанализа. М.: Высшая школа, 1991.
3. **Immunoassays** Essential Data /Ed. R. Edwards. London (UK): NETRIA, St Brththolomew's Hospital.
4. **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.
5. **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.
6. **Голубев С. С., Голубев С. Н.** Прослеживаемость результатов измерений в нанометровом диапазоне к единицам Международной системы еди-

ниц физических величин // Измерительная техника. 2010. № 11. С. 13 – 17; **Golubev S. S., Golubev S. N.** Traceability of measurement results in the nanometric range to the units of the international system of units of physical quantities // Measurement Techniques. 2010. V. 53. N 11. P. 1209 – 1214.

7. **Гоголинский К. В. и др.** Исследование метрологических характеристик измерительного сканирующего зондового микроскопа с применением решеток типа TGZ // Измерительная техника. 2012. № 4. С. 18 – 21; **Gogolinski K. V. et al.** Investigation of the metrological characteristics of a scanning probe measuring microscope using TGZ type calibration gratings // Measurement Techniques. 2012. V. 55. N 4. P. 400 – 405.

8. **ГОСТ Р 8.630–2007.** ГСИ. Микроскопы сканирующие зондовые атомно-силовые измерительные. Методика поверки.

Дата принятия 11.09.2012 г.