

**МЕТОД КАЛИБРОВОЧНЫХ КРИВЫХ ДЛЯ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЭКСПРЕСС-ТЕСТОВ.
Ч. 1. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ЭКСПРЕСС-ТЕСТЫ
С КОЛЛОИДНЫМ ЗОЛОТОМ**

С. С. ГОЛУБЕВ*, Б. Б. ДЗАНТИЕВ, А. В. ЖЕРДЕВ**, Ю. В. КИСЕЛЕВА*,
Я. А. КОРОЛЕНКО*, Ю. А. КУДЕЯРОВ*, В. М. МАЛЮЧЕНКО*,
Н. И. СМЕРНОВА**, Д. В. СОТНИКОВ****

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

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

Рассмотрен принцип действия иммунохроматографических тест-систем. Отмечено, что с их помощью иммунный анализ реализуется как сэндвич-метод в виде прямой зависимости свечения тестовых полосок от концентрации анализируемого вещества или как конкурентный метод с обратной зависимостью. Изложена экспериментальная процедура получения таких зависимостей, необходимая для построения калибровочных кривых. Предложены экспоненциальные выражения для аналитического описания указанных кривых, причем коэффициенты в этих выражениях определяются методом наименьших квадратов. Приведен анализ погрешности метода калибровочных кривых для получения количественных результатов анализа.

Ключевые слова: иммунохроматографические экспресс-тесты, тестовая и контрольная полоски, сэндвич- и конкурентный методы, стандартные разведения, коллоидное золото, калибровочные кривые.

The principle of operation of immunochromatographic test-systems is considered. It is noted that by means of these systems the immune analysis is carried out in the form of direct dependence of test-strips luminescence from the analysed substance concentration or as a competitive method with inverse dependence. The experimental procedure for getting of these dependences needed for plotting the calibration curves is described. The exponential expressions for analytical description of these curves are suggested while the coefficients of these curves were determined by least-squares method. The analysis of the errors of this method for receiving the analysis quantitative results is presented.

Key words: immunochromatographic express-tests, test and control strips, sandwich- and competitive methods, standard dilutions, colloid gold, calibration curves.

Иммунохроматографические экспресс-тесты (тест-полоски) представляют собой один из примеров успешного применения нанотехнологий в биохимии и медицине. Иммунохроматография включает контроль немедицинского использования психоактивных (наркотических) препаратов, быструю диагностику различных заболеваний, в том числе инфекционных, онкологических и сердечных; допинг-контроль, обнаружение беременности и т. д. При всей простоте применения подобных тестов – погружение тест-полоски в пробу и последующая регистрация окрашивания ее определенных зон – механизм реализации анализа достаточно сложен и включает ряд гомогенных и гетерогенных реакций в неравновесном проточном режиме с участием нанодисперсных носителей. Таким образом, иммунохроматографический анализ – пример наукоемкой технологии, когда сложность разработки преобразуется для потребителя в простоту и удобство использования конечного продукта.

Иммунохроматография основана на диффузном (капиллярном) движении элюента (раствора анализируемого вещества) вдоль мембраны (или мультимембранного композита), которое приводит к образованию на разных ее участках специфических иммунных комплексов. Конъюгированный (связанный) с одним из иммунореагентов (чаще всего с антителами) маркер распределяется по мембране, и его наличие в определенных участках по окончании анализа является основанием для вывода о полученных результатах.

Использование маркеров (меток) в иммунохроматографическом анализе обусловлено тем, что при низких концентрациях компонентов образование простого бинарного комплекса антиген–антитело (АГ – АТ) не может быть зарегистрировано ни визуально, ни простыми инструментальными методами, что приводит к усложнению аналитической системы. Одним из путей визуализации комплекса является использование меченых соединений, в которых метка может легко детектироваться в концентрациях, сопоставимых с концентрацией анализируемого соединения. В качестве меток в большинстве случаев используются окрашенные нанодисперсные частицы, чаще всего – коллоидного золота. В последние годы идет активная разработка и других видов тест-систем, в том числе с применением флуоресцирующих маркеров. В данном случае авторы рассматривают тест-системы с использованием коллоидного золота.

Цель предлагаемой работы – описание метода построения калибровочных кривых и изучение возможности их использования для измерения концентрации анализируемых веществ в иммунохроматографических тест-системах.

Поскольку экспресс-тесты представляют собой сравнительно новые объекты для метрологического обеспечения, рассмотрим принцип их действия, детально изложенный, например, в [1, 2].

Принцип действия иммунохроматографических тест-систем. Иммунохроматографический анализ может быть реализован в различных вариантах. Для низкомолекулярных моновалентных антигенов используется, как правило, конкурентный вариант. В этом варианте в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, конкурирующий с ним за центры специфического связывания*, при этом на пористой рабочей мембране в так называемой аналитической (тестовой) зоне иммобилизуется определяемый антиген, а если антигеном является низкомолекулярное соединение – его конъюгат с белком-носителем. Затем на рабочей мембране формируется так называемая контрольная зона с иммобилизованным антивидовым антителом, способным связывать любые молекулы антитела, использованного в тест-системе. На стартовый участок тест-полоски наносится конъюгат антител с красителем, чаще всего с частицами коллоидного золота диаметром 5 – 50 нм. Тест-полоска дополнительно комплектуется впитывающими крупнопористыми мембранами, размещаемыми на начальном и конечном участках и обеспечивающими латеральное движение жидкости по капиллярам мембран.

Собственно анализ с использованием иммунохроматографической тест-полоски сводится к ее погружению в жидкую тестируемую пробу и регистрации через 5 – 15 мин (время, достаточное для продвижения фронта впитавшей жидкости вдоль тест-полоски) окрашивания в контрольной и аналитических зонах.

При погружении тест-полоски в пробу, не содержащую детектируемый антиген, меченые антитела начинают перемещаться с фронтом жидкости и, дойдя до зоны с иммобилизованными антигенами, образуют с ними иммунные комплексы АГ–АТ, концентрируясь в аналитической

* См. рис. 1 статьи С. С. Голубева и др. Метрологическое обеспечение систем быстрой медицинской диагностики // Метрология. 2012. № 10. С. 8.

зоне с образованием окрашенной благодаря маркеру полоски. Избыточный конъюгат антитела с красителем проходит до контрольной зоны, где связывается с антивидами антителами, окрашивая контрольную полоску. Таким образом, наличие двух окрашенных полосок (тестовой и контрольной) свидетельствует об отсутствии анализируемого вещества (антигена) в пробе.

Если же в пробе содержится анализируемый антиген (в концентрации не ниже установленного порогового уровня), он блокирует активные центры антител в составе конъюгата с маркером, не позволяя им связаться с антигеном в аналитической зоне и сформировать окрашенную полоску. При этом связывание конъюгата маркер – антитела с антивидами антителами в контрольной зоне подтверждает сохранение функциональных свойств тест-полоски.

Из приведенного выше описания следует, что в конкурентном варианте иммунохроматографического экспресс-теста с увеличением концентрации анализируемого вещества яркость окрашивания тестовой полосы уменьшается (обратная зависимость).

В неконкурентном (сэндвич) методе иммунохроматографии антиген образует комплекс с двумя молекулами антител – на поверхности конъюгата с маркером и иммобилизованными в аналитической зоне. Соответственно после контакта с пробой начинается движение жидкости вдоль тест-полоски, смывающей коллоидный конъюгат. В ходе этого движения меченые антитела перемещаются с ее фронтом по мембране. Если определяемого антигена в пробе нет (или его концентрация ниже пороговой), то антитела свободно проходят аналитическую зону и, продолжая движение, концентрируются в контрольной зоне, связываясь с антивидами антителами и окрашивая эту зону.

Если в пробе присутствует антиген с концентрацией не ниже порогового уровня, то он связывается с коллоидным конъюгатом антител в стартовой зоне. Эти двойные комплексы продолжают движение до аналитической зоны, где антиген связывается с иммобилизованными на мембране антителами, образуя тройные комплексы и способствуя появлению окрашенной полоски в аналитической зоне. Сохранение тест-полоской функциональных свойств контролируется окрашиванием контрольной полоски, вызванным связыванием избытка коллоидного конъюгата с антивидами антителами.

Таким образом, в неконкурентном методе иммунохроматографии, в противоположность конкурентному варианту формирование на тест-

полоске двух окрашенных зон свидетельствует о положительном результате (выявлении антигена в концентрации не ниже пороговой), тогда как формирование одной окрашенной зоны означает отсутствие антигена.

При этом структура тестовой полосы остается точно такой же, как и в конкурентном варианте. Однако реагенты и подбор мембран (по степени пористости и гидрофильности) отличаются.

В неконкурентном варианте возрастание концентрации определяемого соединения сопровождается увеличением концентрации образующегося комплекса антигена и антител, меченных коллоидной меткой, ростом степени связывания этого комплекса в аналитической зоне и, следовательно, более высокой яркостью окрашивания. В этом случае зависимость яркости окрашивания от концентрации анализируемого соединения описывается возрастающей функцией, и до определенных значений яркость окрашивания тестовой зоны пропорциональна концентрации определяемого вещества (антигена). Начиная с некоторых значений концентрации эта пропорциональность нарушается, в частности из-за того, что иммобилизованные на мембране антитела постепенно оказываются задействованными в тройных комплексах, вызывающих окрашивание аналитической полоски, и дальнейшее повышение концентрации антигена уже не приводит к образованию дополнительных иммунохимических комплексов и, следовательно, к увеличению яркости окрашивания, т. е. наступает «насыщение» рассматриваемой зависимости.

Приведенное описание прямой и обратной зависимостей яркости окрашивания тестовых полосок от концентрации анализируемого вещества находит подтверждение в проведенных ранее экспериментах по их установлению [1, 2]. Также при выполнении работы авторами были выполнены дополнительные эксперименты по определению указанных зависимостей с целью отработки методики построения калибровочных кривых.

Описание экспериментов и методики построения калибровочных кривых. Часто, особенно при определении наркотиков и диагностике опасных заболеваний, необходимо протоколировать результаты анализа и сохранять их в базе данных. Поэтому высока потребность в простых портативных детекторах для иммунохроматографических тест-полосок. В настоящее время такие приборы стали производиться рядом фирм и появились на мировом рынке.

В Институте биохимии им. А. Н. Баха РАН совместно с «СИН-ТЭКО-КОМПЛЕКС» был разработан специализированный микроанализатор «РЕФЛЕКОМ», основанный на видеоцифровой индикации светимости окрашенных полос [3]. Этот компактный прибор позволяет регистрировать изображение иммунохроматограммы, проводить качественный и количественный анализ результатов, создавать и поддерживать базы данных по результатам тестирований. Изображение полоски, полученное цифровой видеокамерой, трансформируется в данные сначала о профиле распределения метки вдоль рабочей мембраны, а затем — светимости полос в аналитической и контрольной зонах.

При качественном тестировании прибор выдает заключение о положительном или отрицательном результате анализа. При количественном тестировании результаты измерений сопоставляются с калибровочными кривыми (градуировочными характеристиками), полученными для стандартных разведений данного соединения, что позволяет измерить концентрацию этого соединения в пробе. Аппаратно-программный комплекс, представленный этим микроанализатором, значительно расширяет области применения иммунохроматографических тестов и делает возможными автоматизированную обработку и учет результатов анализа.

Таким образом, для превращения иммунохроматографического анализа из качественного метода в количественный используется хорошо известный в обычной хроматографии метод калибровочных кривых (градуировочных характеристик). С помощью микроанализатора измеряются коэффициент светового отражения (КСО) и, в конечном итоге, светимость I аналитической зоны иммунохроматографической тест-системы при известной концентрации n конкретного антигена. Получившийся при разных значениях n набор экспериментальных точек на плоскости (n , I) методом наименьших квадратов (МНК) аппроксимируется подходящей функциональной зависимостью, которая и называется калибровочной кривой (градуировочной характеристикой).

Если необходимо установить неизвестную концентрацию конкретного антигена, то, измерив светимость аналитической полосы, с помощью калибровочной кривой, снятой для этого антигена, определяют его концентрацию в пробе.

Следовательно, построение калибровочной кривой для иммунохроматографического анализа включает в себя, по меньшей мере, четыре этапа.

1. Экспериментальное нахождение точек на плоскости (n , I), отвечающих неизвестной пока функциональной зависимости светимости аналитической зоны от концентрации анализируемого вещества. В этом случае при каждом стандартном разведении пробы проводят многократные наблюдения сигнала светимости, полученного от разных экземпляров набора из 20 тест-пластинок одного типа. Важную роль при этом играет процедура приготовления проб, детально описанная в соответствующей методике измерений [4].

2. Обработка результатов многократных наблюдений в соответствии с рекомендациями [5] (учет поправок на систематические погрешности, исключение грубых ошибок и промахов, установление принадлежности результатов наблюдений к нормальному распределению) и определение доверительной погрешности измерений.

3. Использование МНК для аппроксимации получившегося набора точек подходящей функциональной зависимостью и нахождение параметров этой зависимости [6].

4. Оценка погрешности построения калибровочной кривой (градуировочной характеристики) по [5, 7].

Перечисленные этапы описаны в разработанной авторами методике измерений [4], структура и содержание которой соответствуют требованиям [8].

В [4] основной интерес представляют части, содержащие описание экспериментальной процедуры измерения светимости аналитической зоны в зависимости от концентрации анализируемого вещества, оценки погрешности измерения светимости, процедуры построения калибровочной кривой и оценки погрешности такого построения.

Измерения светимости аналитических зон тест-систем проводили на микроанализаторе «РЕФЛЕКОМ» при стандартных разведениях анализируемых веществ. Прибор обеспечивал относительную погрешность измерения светимости, равную 5,0 %.

Концентрации для получения калибровочных кривых выбирали, исходя из значения концентрации, соответствующего пороговому уровню (ПУ) для данной тест-системы и данного соединения, т.е. из значения концентрации антигена в пробе, соответствующего изменению результатов регистрации сигнала в аналитической зоне. Для тест-систем с прямой зависимостью сигнала ПУ это максимальная концентрация, при которой сигнал еще отсутствует, для тест-систем с обратной

зависимостью ПУ – минимальная концентрация, начиная с которой сигнал уже отсутствует. Концентрация антигена измерялась в миллиграммах на миллилитр.

При характеристике тест-систем с обратной зависимостью сигнала использовали стандартные разведения со значениями концентраций, равными 0 (вода); 0,1ПУ; 0,2ПУ; 0,3ПУ; 0,4ПУ; 0,6ПУ; 0,8ПУ и 0,9ПУ. При характеристике тест-систем с прямой зависимостью сигнала значения концентраций составляли 0 (вода); 0,1·20ПУ; 0,4·20ПУ; 0,6·20ПУ; 0,8·20ПУ; 0,9·20ПУ и 20·ПУ. Порядок приготовления стандартных разведений описан в п. 9, порядок проведения измерений светимости – в п. 10 методики [4].

Измерения светимости аналитической зоны были проведены для тест-системы определения бензодиазепина (обратная зависимость) (рис. 1) и маркера туберкулеза – антител к белку Rv0934 (38 кДа) микобактерии (прямая зависимость) (рис. 2). Для измерений при каждом значении концентрации использовали 20 тест-полосок. После этого в соответствии с рекомендациями [5] вычисляли средние значения светимости $\bar{I}$ и оценивали среднее квадратическое отклонение (СКО) S_I по известной формуле

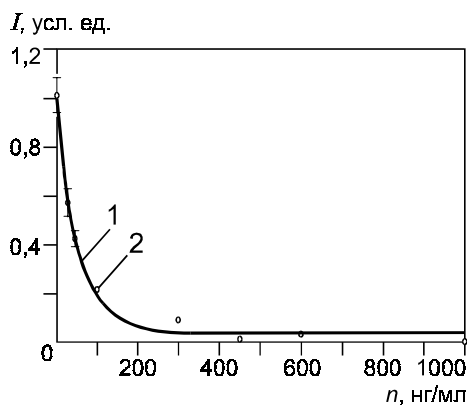


Рис. 1. Экспериментальные данные и калибровочная кривая для бензодиазепина (обратная зависимость):

1 – аппроксимация; 2 – данные

$$S_I = \sqrt{\sum_{i=1}^N (I_i - \bar{I})^2 / (N - 1)}, \quad N = 20.$$

С помощью критерия 3σ оценивали наличие грубых ошибок. Если они обнаруживались, то эти результаты отбрасывали и пересчитывали средние значения и СКО светимости. Далее с помощью d -критерия [5], применяемого при числе измерений $N < 50$, определяли принадлежность совокупности результатов измерений светимости при каждом

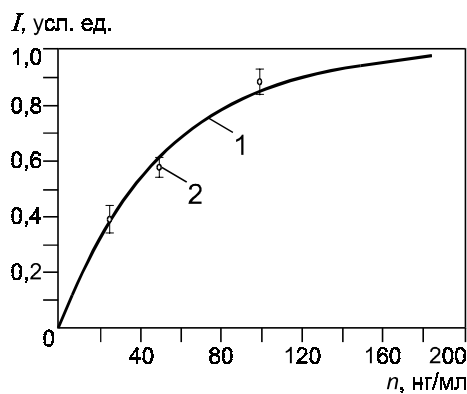


Рис. 2. Экспериментальные данные и калибровочная кривая для маркера туберкулеза (прямая зависимость): обозначения те же, что и на рис. 1

значении концентрации нормального распределению.

Необходимо отметить, что использование таких статистических критериев, как критерий χ^2 Пирсона и d -критерий [5], показало, что результаты измерений светимости на микроанализаторе «РЕФЛЕКОМ» с большой точностью (на уровне значимости порядка 0,01) можно описать нормальным распределением.

При каждом значении концентрации по формуле

$$\varepsilon = 2,1S_t / \sqrt{N},$$

где коэффициент 2,1 – коэффициент Стьюдента при доверительной вероятности $P = 0,95$ и числе измерений $N = 20$, были оценены доверительные границы случайной погрешности измерения.

Оказалось, что в данном случае приходится иметь дело с неравноточными измерениями. При этом для обратной зависимости случайная составляющая погрешности измерений светимости, например для бензодиазепина, существенно уменьшается при увеличении концентрации антигена в пробе (от 0,025 до 0,005 усл. ед., т. е. от 2,50 до 0,50 % (см. рис. 1)). Для прямой зависимости тенденции такого типа не выявлена.

Необходимо отметить, что суммарная погрешность измерения светимости существенным образом определяется систематической составляющей, в которую входят следующие погрешности: средства измерений, вносимая оператором при проведении измерений, округления и методическая погрешность приготовления проб стандартных разведений, зависящая от погрешностей взвешивания навесок и определения объема растворителя с помощью пипеток. Оценки показывают, что систематическая составляющая суммарной погрешности измерения на порядок превышает случайную составляющую. В этой ситуации не-

равноточность измерений, обусловленную изменением СКО, при окончательной оценке погрешности измерения концентрации антигена методом калибровочных кривых можно не учитывать.

Таким образом, следуя [5], можно утверждать, что суммарная погрешность измерения светимости (ее верхняя оценка) определяется систематической составляющей и принимает значение, равное 15 %, что на порядок превышает случайную составляющую. Такое значение определяется точностью взвешивания (готовились малые объемы градуировочного раствора, и погрешность аналитических весов в 0,0001 г при взвешивании 1 мг навески привела к 10 %-ному вкладу в суммарную относительную погрешность). Усовершенствование процедуры приготовления проб, например приготовление большего объема градуировочного раствора, уменьшает это значение до 10 % и меньше.

Если систематическая погрешность принимает указанные значения, то из этого, в частности, следует, что проводить двадцатикратные измерения светимости при каждом стандартном разведении нецелесообразно, достаточно десяти измерений, чтобы считать их многократными.

Аппроксимация экспериментальных данных по МНК. Необходимо отметить, что метод калибровочных кривых для иммуноаналитических, в том числе иммунохроматографических тест-систем рассматривался в ряде работ [9 – 14].

Так в [9] приведен обзор методов построения кривых для иммуноферментного анализа и предложено представлять данные для конкурентных анализов, предварительно вычитая из измеренных значений сигнала среднее значение фонового сигнала и записывая полученные результаты в виде десятичной дроби от среднего значения сигнала в калибровочной пробе «0». Величины, получаемые в результате такой обработки, обозначают B/B_0 либо r . Для переменной r в дальнейшем применяется преобразование $\log it$, которое имеет вид

$$\log it(r) = \ln(1-r)/r.$$

Искомую аналитическую зависимость для конкурентного варианта анализа предлагается аппроксимировать четырехпараметрической зависимостью вида

$$Y = A + \frac{(B-A)}{(1+Z)}, \quad Z = e^{C+D \ln(X)}, \quad (1)$$

где A , B , C , D – подгоночные параметры, т. е. A , B – средние уровни сигнала для максимально возможной («бесконечной») и нулевой концентраций аналита, соответственно (параметр A часто обозначается как «фоновый сигнал»); C – отрезок на оси Y , отсеченный прямой, полученной при аппроксимации; D – угловой коэффициент этой прямой.

Подобная методология предлагается и в [12].

В принципе, при построении калибровочных кривых можно пользоваться методами, изложенными в указанных работах. При этом следует помнить, что использование большого числа подгоночных параметров (четырех параметров) вовсе не означает улучшения приближения к действительной зависимости между исследуемыми величинами, поскольку общим недостатком указанных работ является отсутствие оценки погрешностей измерения светимости и приготовления проб. Учет таких погрешностей может сделать нецелесообразным применение аппроксимации с четырьмя подгоночными параметрами.

Модель взаимодействий, описываемая (1), соответствует формально-кинетическому представлению о конкурентном взаимодействии в тест-системе антител с содержащимся в пробе и иммобилизованным стандартным антигеном. В классических работах, посвященных количественному рассмотрению иммунохимических реакций в гетерогенных системах [13, 14], используют подходы, разработанные для описания взаимодействий в растворе. Однако учет особенностей гетерогенных взаимодействий, а в случае иммунохроматографии – еще и проточного характера аналитической системы делает неоднозначным утверждение об адекватности рассмотренных выше принимаемых приближений. Возможности независимого корректного определения всех параметров, необходимых для численного анализа модели гетерогенного взаимодействия, весьма ограничены, и вопрос об адекватности принимаемых приближений фактически остается открытым.

В такой ситуации было решено применить упрощенный подход к проблеме построения калибровочных кривых, минимизирующий количество подгоночных параметров. Отметим, что он должен обладать минимальной погрешностью аппроксимации и учитывать основные особенности происходящих в тест-системе реакций.

Первая задача решается при аппроксимации МНК, обеспечивающим, как известно [15], минимальную дисперсию.

Форма полученных концентрационных зависимостей сигнала позволяет рассмотреть в качестве потенциального средства аппроксимации

обратной зависимости следующую аналитическую зависимость между светимостью тестовой полоски и концентрацией анализируемого вещества:

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

где A – светимость полоски при нулевой концентрации аналита; B – константа, описывающая наклон линейной зависимости $y = -Bn$ после линеаризирующего преобразования $y = \ln[(I - C)/A]$, а константа C введена для учета фонового сигнала.

Отметим, что аналитическая зависимость (2) получена из предположения о линейной зависимости между бесконечно малыми изменениями светимости и концентрации, т. е. из предположения, что $dI = -BIdn$.

В зависимости (2) используется меньше параметров по сравнению с (1). В ряде случаев можно считать $C = 0$, тогда зависимость (2) становится двухпараметрической.

Для иммунохроматографических тест-систем с прямой зависимостью сигнала учет механизма «насыщения», о котором говорилось выше, приводят к аппроксимации концентрационной зависимости функцией вида

$$I(n) = A(1 - e^{-Bn}), \quad (3)$$

здесь A – асимптотическое значение светимости при максимально возможной, «бесконечной» концентрации аналита; B – наклон линейной зависимости $y = -Bn$ при линеаризирующем преобразовании $y = \ln[(A - I)/A]$.

Графики (калибровочные кривые) аппроксимирующих функций (2), (3) приведены на рис. 1, 2. Расчеты выполняли в программном пакете Matlab. При этом подгоночные параметры для определения бензодиазепина (обратная зависимость, рис. 1), определенные с использованием МНК, имеют значения $A = 0,966$, $B = 0,020$ [1/ n], $C = 0,036$. Как уже отмечалось, в ряде случаев $C = 0$, что в данной работе не приводит к существенным изменениям величин A и B . Для определения маркера туберкулеза (прямая зависимость) $A = 1000$, $B = 0,019$ [1/ n].

Процедура аппроксимации реализуется программно и характеризуется погрешностью, вносимой соответствующим программным обеспечением в суммарную систематическую погрешность построения ка-

либровочных кривых. Принято считать, что аппроксимация удачна, если вклад от соответствующей погрешности не превышает десятых долей процента от вклада, обусловленного другими источниками систематической погрешности.

Из [6] известно, что дисперсия S_0^2 , характеризующая разброс измеренных средних значений светимости относительно вычисленных с помощью МНК по формулам (2), (3), выражается формулой

$$S_0^2 = \sum_{j=1}^m (I_j - \bar{I}_j)^2 / (m-1), \quad (4)$$

где m – число стандартных разведений анализируемого вещества, при которых производились многократные ($N = 20$) измерения светимости полосок; $m - 1$ – число степеней свободы линейных зависимостей, получившихся после линеаризирующих преобразований; I_j – вычисленные по МНК значения светимостей при j -м стандартном разведении;

$\bar{I}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_{i,j}$ – вычисленное по результатам многократных измерений

$I_{i,j}$ среднее значение светимости при j -м стандартном разведении.

Относительная погрешность вычислений параметров A и B , как для прямой, так и для обратной зависимости, определяется дисперсией (4), равной 0,1 %, и составляет сотые доли процента. Это значение существенно меньше погрешности измерения светимости аналитических полосок, как и прогнозировалось.

Измерение концентрации методом калибровочных кривых, по сути, является методом косвенных измерений. Для оценки погрешности этих измерений выражения (2), (3) следует рассматривать как функциональные зависимости, их определяющие. В результате получаем следующие выражения для оценки погрешностей измерения концентраций при обратной зависимости:

$$\delta_n = [(\delta_I + \delta_A) + \delta_B] / y, \quad (5)$$

где $y \approx \ln I / A$.

Как было отмечено выше, погрешности расчета коэффициентов аппроксимации малы по сравнению с погрешностью измерения светимости тестовой полоски, поэтому их можно не учитывать. По этой причине упрощенную оценку погрешности измерения концентрации

методом калибровочных кривых для обратной зависимости можно проводить по формуле

$$\delta_n \approx \delta_I / y. \quad (6)$$

Для прямой зависимости погрешность можно оценивать как

$$\delta_n = \frac{I}{y(A-I)}(\delta_I + \delta_A) + \delta_B, \quad (7)$$

где $y = \ln[1 - (I/A)]$.

Для упрощенной оценки имеем

$$\delta_n \approx \frac{I}{y(A-I)} \delta_I. \quad (8)$$

В рабочем диапазоне концентраций с учетом того, что значение параметра A порядка единицы, а светимости I малы, формула (8) совпадает с (6).

Отметим также, что систематическая составляющая погрешности учтена в суммарной погрешности измерения светимости тестовой полоски, как того требует [7].

Из формул (5), (7) следует, что погрешность измерения концентраций методом калибровочных кривых существенным образом зависит от измеренного значения светимости. Графики этой зависимости представлены на рис. 3. Из них следует, что в случае обратной зависимости сигнала погрешность измерения концентрации при малых концентрациях может достигать 40 % и более. В районе критической концентрации (около

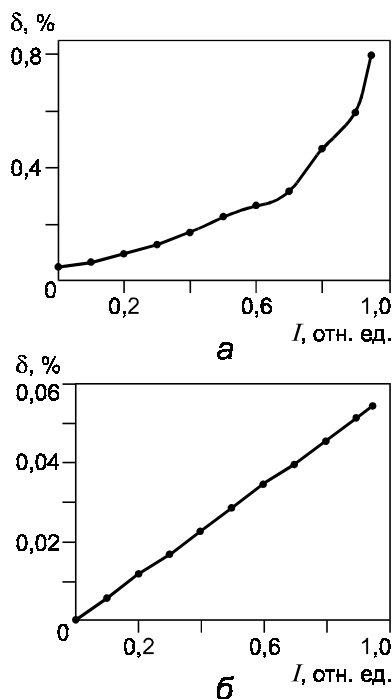


Рис. 3. Погрешность измерения концентрации как функция светимости тестовой полосы:

a , b – обратная и прямая зависимости, соответственно

300 нг/мл в случае тест-системы для бензодиазефина) погрешность составляет порядка 15 % (см. рис. 3, а).

При прямой зависимости погрешность измерения концентрации из-за иного линеаризирующего преобразования менее существенно зависит от светимости и принимает в рабочей области концентраций значения порядка 2 – 5 % (см. рис. 3, б).

Таким образом, из представленных результатов определения метрологических характеристик иммунохроматографических тест-систем следует, что повышение точности результатов анализа лимитируется главным образом методической погрешностью приготовления стандартных разведений. Их дальнейшее совершенствование с точки зрения метода калибровочных кривых должно включать как поиск более адекватных функциональных зависимостей между исследуемыми величинами и выбор более сходящихся вычислительных схем, так и существенное уменьшение погрешности взвешивания при приготовлении соответствующих проб.

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»).

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. **Wong R., Tse H.** Lateral flow immunoassay /Ed. R. Wong, H. Tse. N.Y.: Humana Press, 2009.
3. **Старовойтова Т. А. и др.** Аналитическая платформа для проведения биохимических и иммунологических исследований в микроматричном формате с видеоцифровой регистрацией //Биомедицинский журнал Medline.ru. 2010. Т. 11. С. 44–62.
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. **ГОСТ 8.207–76.** ГСИ. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения.

6. **Семенов Л. А., Сирая Т. Н.** Методы построения градуировочных характеристик средств измерений. М.: Изд-во стандартов, 1986.
7. **Р 50.2.028–2003.** ГСИ. Алгоритмы построения градуировочных характеристик средств измерений состава веществ и материалов и оценивание их погрешностей (неопределенностей). Оценивание погрешности (неопределенности) линейных градуировочных характеристик при использовании метода наименьших квадратов.
8. **ГОСТ Р 8.563–2009.** ГСИ. Методики (методы) измерений.
9. **Свежова Н. В. и др.** Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. Ч. I. Теоретические основы//Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 1. С. 13 – 22.
10. **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 //Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 1. С. 23 – 36.
11. **Hage D. S. e. a.** Development of a theoretical model for chromatographic – based competitive binding immunoassays with simulataneoos injection of sample and lable //Anal. Chem. 1999. N 71 (15) P. 2965 – 2975.
12. **Findlay J. W. A., Dillard R. F.** Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays //J. AAPS 2007. N 9(2). Art. 29. P. E260 – E267.
13. **Bell G. I., DeLisi C. P.** Antigen binding to receptors on immunocompetent cells: I. Simple models and interpretation of experiments //Cellular Immunology. 1974. N 10(3). P. 415 – 431.
14. **Goldstein B., Dembo M.** Approximating the effects of diffusion on reversible reactions at the cell surface: ligand-receptor kinetics //Biophys. J. 1995. N 68(4). P. 1222 – 1230.
15. **Кузнецов В. А., Исаев Л. К., Шайко И. А.** Метрология. М.: СТАНДАРТ-ИНФОРМ, 2005.

Дата принятия 11.09.2012 г.