

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ РЕФЕРЕНТНОЙ МЕТОДИКИ КАЛИБРОВКИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ (ЭКСПРЕСС - ТЕСТОВ) ШИРОКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, В ТОМ ЧИСЛЕ, МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

М.В. Зеленкова, Ю.А. Кудеяров, Е.В. Кулябина, О.Н. Мелкова, А.Н. Паньков.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГУП «ВНИИМС»), Россия, Москва, e-mail: office@vniims

Ю.Ю. Венгеров.

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Россия, Москва, e-mail: inbi@inbi.ras.ru

В статье приводятся результаты разработки и апробации референтной методики калибровки тест-систем (экспресс-тестов) для анализируемого вещества с оценкой погрешности измерения его концентрации, которая позволяет проводить калибровку иммунохроматографических тест-систем (экспресс-тестов) широкого применения, в том числе, медицинского назначения, с прямой и обратной зависимостью детектируемого сигнала от концентрации определяемого соединения.

Ключевые слова: *методика калибровки, экспресс-тесты, концентрация вещества, косвенные измерения.*

The results of development and validation of reference calibration techniques of test systems (rapid tests) for analyte measurement error estimate its concentration, which allows calibration of immunochromatographic test systems (rapid tests) wide application, including medical supplies to the forward and reverse dependence of the detected signal from the concentration of the compound.

Key words: *calibration technique, rapid tests, the concentration of the substance, indirect measurements.*

Современный этап развития метрологического обеспечения биологических, биохимических и медицинских технологий характеризуется значительным повышением интереса к разработке и применению так называемых референтных методик измерений. По определению, референтная методика это методика, принятая для получения результатов измерений, которые могут быть использованы для оценки правильности измеренных значений величины, полученных по другим методикам измерений величин того же рода, а также для калибровки или для определения характеристик стандартных образцов. Из определения следует, что референтная методика представляет собой более высокий по своей метрологической значимости документ, позволяющий проводить оценку правильности других методик, а также характеристик стандартных образцов.

С учетом имеющегося опыта, наработанного ранее при выполнении работ по метрологическому обеспечению иммунохроматографических тест-систем [1,2], в ФГУП «ВНИИМС» в 2013 г. была поставлена научно-исследовательская работа по разработке и апробации референтной методики калибровки иммунохроматографических тест-систем (экспресс-тестов) широкого применения, в том числе, медицинского назначения.

В качестве анализируемого вещества был выбран иммуноглобулин Е, поскольку анализ на содержание IgE в сыворотке широко применяется в медицине для определения предрасположенности, диагностики и мониторинга хода лечения аллергий и связанных с ними патологических состояний.

Как и в предыдущем случае, основным методом, который был положен в основу разработанной референтной методики, был метод калибровочных кривых. Особенность разработанной референтной методики заключается в том, что она может быть использована только в тех случаях, когда измеряемой величиной методом калибровочных кривых является концентрация анализируемого вещества. В этом состоит как ее достоинство, так и определенная ограниченность.

Основное отличие выполненной работы от предыдущей заключается в том, что если ранее так называемые стандартные разведения проб проводились в воде, то теперь пробы брались в биологически активной среде (в человеческой сыворотке), и для их разведения использовались забуференный фосфатами физиологический раствор.

Следует также отметить, что пробоподготовка в биологически активных средах существенно усложняется наличием так называемой «матрицы», состоящей в данном случае из нескольких модификаций иммуноглобулина и приводящей к сложному фону и помехам, препятствующим идентификации именно иммуноглобулина IgE. Это привело к тому, что пришлось применять специальные меры для идентификации и визуализации специфических иммунных комплексов, образующихся в процессе анализа. Эти меры свелись к использованию в качестве меток наряду с традиционным коллоидным золотом авидина и биотина.

Авидин и биотин используются, прежде всего, для распознавания именно IgE в смеси иммуноглобулинов в сыворотке и, тем самым, для повышения эффективности тест-системы из-за большого значения константы связи между этими веществами. Тем самым решается проблема идентификации IgE в смеси иммуноглобулинов из-за влияния «матрицы», о которой уже говорилось.

Основные проблемы, возникшие в ходе выполнения работы, удалось в значительной степени решить, благодаря использованию для получения экспериментальных данных микроанализатора «РЕФЛЕКОМ», рассчитанного для работы с широким набором экспресс-тестов, тщательно разработанной процедуре приготовления проб, выбору физико-химически обоснованных аппроксимирующих функций и использованию для оценки правильности и качества аппроксимации такого показателя как коэффициент детерминации.

В ходе выполнения работы были решены следующие задачи.

1. Определена аналитическая зависимость для калибровочных кривых тест-систем, имеющая физико-химическое обоснование, являющееся следствием принципа действия экспресс-тестов.
2. С помощью микроанализатора «РЕФЛЕКОМ» получены экспериментальные результаты по зависимости интенсивности свечения проб от их концентрации для иммуноглобулина IgE в сыворотке человека. Измерения проводились на лабораторной базе Института биохимии им. А. Н. Баха РАН.
3. Разработан проект референтной методики и проведена ее экспериментальная апробация. При разработке методики были учтены рекомендации ГОСТ Р ИСО 15193-2007 [3] и ГОСТ Р 8.563-2009 [4].
4. Итоговый результат работы представлен референтной методикой калибровки тест-систем (экспресс-тестов) для анализируемого вещества с оценкой погрешности измерения его концентрации, которая была апробирована, аттестована и внесена в Реестр аттестованных методик измерений. Возможности методики показаны на примере измерения концентрации иммуноглобулина IgE в сыворотке человека. Измеренная по калибровочной кривой концентрация

IgE равна $50,0 \pm 12,0$ нг/мл (8,0% исходной концентрации). Погрешность измерения концентрации, оцененная по ГОСТ Р 8.736-2011 [5], составила 24,0%, что удовлетворяет требованиям к точности измерений методики. В свою очередь, коэффициент детерминации, характеризующий аналитическую достоверность метода, равен 0,92, что указывает на высокую адекватность аппроксимации экспериментальных данных калибровочной кривой.

Разработанная методика, являющаяся одной из первых попыток такого рода, устанавливает общие принципы калибровки иммунохро-матографических тест-систем, начиная от пробоподготовки и кончая оценкой погрешности измерения концентраций анализируемых веществ. При этом пробоподготовка формулируется в виде, пригодном как для приготовления водных калибровочных растворов анализируемых веществ, так и для растворов в биологически активных средах.

Референтная методика может применяться для оперативного определения концентрации анализируемых веществ (аллергенов, ранних маркеров сердечных заболеваний, наркотических веществ, алкоголя, маркеров беременности и т.д.) в биологически активных средах, что представляет несомненный интерес для медицинских целей.

Основной вывод работы сводится к тому, что с помощью микроанализатора «РЕФЛЕКОМ» на основе разработанной методики сугубо качественный метод экспрессного тестирования можно превратить в метод количественного определения концентрации аналита в пробе при условии принятия специальных мер по однозначной идентификации аналита в биологически активной среде.

1. Голубев С. С., Дзантиев Б. Б., Же рдев А. В., Киселева Ю. В., Короленко Я.А., Кудеяров Ю.А., Малюченко В. М., Смирнова Н. И., Сотников Д. В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 1. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом. Метрология № 10,2012, с.с. 14-29.
2. Методика измерений. ФР.1.39.2011.11003. Определение калибровочных кривых иммунохроматографических тест-систем, включая тест-системы с прямой и обратной зависимостью детектируемого сигнала от концентрации определяемого соединения.
3. ГОСТ Р ИСО 15193-2007. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерения величин в пробах биологического происхождения. Описание референтных методик выполнения измерений.
4. ГОСТ Р 8.563-2009. ГСП. Методики (методы) измерений.
5. ГОСТ Р 8.736-2011. ГСП. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения.