

## ОЦЕНКА МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БИОСЕНСОРНЫХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

### Постановка задачи исследования

Бурное развитие в последние годы иммуноферментного анализа (ИФА) как для задач медицинской диагностики, так и экологического контроля сверхмалых концентраций химических веществ, обусловлено его высокой чувствительностью, относительно небольшим временем анализа и возможностью включения в структуру автоматизированных информационно-измерительных систем.

Разработано много вариантов ИФА, различающихся типом твердой фазы, способом присоединения к ней специфического реагента, видом фермента в конъюгате, способом интерпретации результатов анализа, типом используемого сорбента, способом измерения активности фермента и т.д. Модификация классического ИФА, выполненная авторами, заключается в регистрации биосенсорным преобразователем электрическим способом иммуноферментной реакции, проходящей в тонкой мембране сорбированного белка на пластиковом электроде с электропроводящей подложкой (рис. 1).

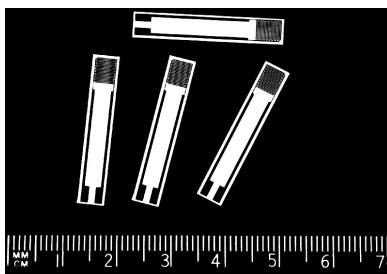


Рис. 1 – Биосенсорные преобразователи

Практическая реализация метода ИФА требует изучения совокупности причин, влияющих на точность результатов реакции. Чувствительность ИФА определяется целым рядом параметров, к которым относятся, прежде всего, адсорбционные свойства подложки, ее электропроводность, плотность распределения структурных и глобулярных пор в материале подложки, количество сорбированного белка, природа специфического реагента и др. Сорбционная способность белковых рецепторных материалов во многом зависит от свойств подложки измерительного

© Ю.Г. Войлов, А.Л. Овчинников , 2005

электрода, в качестве которой выступает углеродный композитный материал.

Известно, что сорбирование макромолекул белка происходит в макропорах, размеры которых более 200 Å (0,02 мкм). В углеграфитовых материалах наибольший объем пор приходится на микро и макропоры, причем основной объем приходится на поры 90 Å - 6 мкм (максимум 1-3 мкм). Помимо структурных пор, присущих данному материалу, при формировании рабочей поверхности твердофазного носителя на базе углеграфитовых композиционных материалов (УКМ) образуются глобулярные поры за счет пространственного контакта сфер композита, а также зоны, образованные сечением сферы и плоскостью связующего. Для образования глобулярных пор, способных сорбировать белки, минимальный размер сфер углеграфита должен быть равным 0,05-0,07 мкм. Учитывая, что практическое применение находят углеграфитовые материалы с размерами более 1 мкм, то заведомо обеспечивается условие образования сорбирующих белки глобулярных пор с размерами более 0,4 мкм. Поверхность электрода с сорбированными молекулами белка представлена на рис. 2 в виде фотографии, полученной с помощью электронного микроскопа.

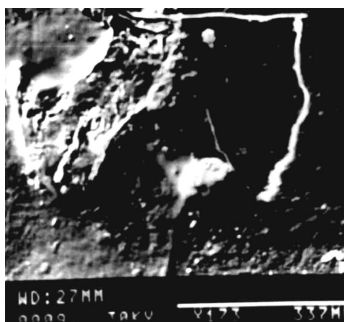


Рис. 2 – Элементы поверхности электрода с сорбированными глобулами белка.

Однако, из-за отклонения в силу ряда причин параметров технологических режимов при изготовлении электродов, имеет место значительная вариабельность свойств внутри комплекта однотипных электродов и еще большая вариабельность внутри выпускаемой партии. В то же время, повышение качества ИФА заключается в повышении достоверности получаемых результатов анализа, то есть в уменьшении вариабельности результатов лабораторных анализов [1].

Целью исследований, результаты которых представлены в настоящей статье, является оценка источников ошибок иммуноферментной реакции и, в частности, ошибок, связанных с неоднородностью свойств электродов, их численных значений, определение максимальных и минимальных границ.

## Методика экспериментальных исследований

Сумма погрешностей иммуноферментного анализа, согласно [2], может быть описана дифференциальным уравнением вида:

$$\frac{dC_0}{C_0} = \frac{dA}{A} + \frac{dS}{l} + n \frac{dm}{m} + \frac{dD}{D}, \quad (1)$$

где:  $C_0$  – начальная концентрация вещества в растворе;

$m$  – коэффициент титрования;

$n$  – степень титрования или титр;

$A$  – коэффициент инкубации рецепторного белка;

$S$  – площадь измерительного слоя;

$D$  – коэффициент преобразования концентрации в электрический потенциал.

Из уравнения (1) видно, что причины, влияющие на точность результатов ИФА, делятся на две группы. Одна группа обусловлена применяемыми в реакции реагентами - антитела, антигены, субстраты,  $p^H$  применяемых реагентов и т.п. Другая группа - инструментальные погрешности, куда относятся дозирование, электрометрирование, неоднородность свойств электродов.

Погрешности, вносимые изменением активности измерительного слоя, зависят от величины его площади (около 3%) [2], объема остающегося раствора после инкубации контролируемого вещества, что дает изменение концентрации реагента и величины поверхности сорбции, а также от степени однородности сорбционной поверхности электрода [5]. Погрешность определения коэффициента инкубации рецепторного белка в среднем составляет 1.5% и зависит от электронного микроскопа и ошибок, вносимых оператором, обрабатывающем экспериментальные фотоматериалы.

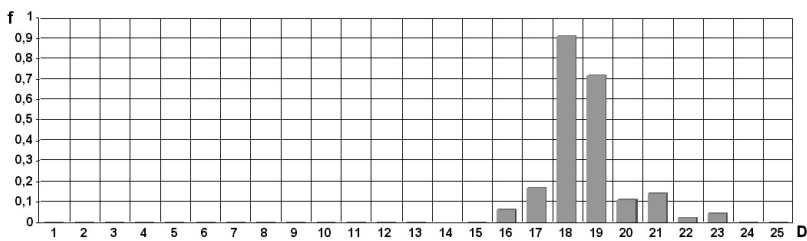
В процессе экспериментальных исследований изучались биосенсорные первичные преобразователи информационно-измерительной системы Рось-5, разработанной НИПКИ "Искра" МОН Украины и предназначенной для контроля сверхмалых концентраций наркотических веществ. Были измерены значения коэффициента инкубации рецепторного белка и составлены статистические выборки коэффициентов как партии биосенсорных электродов, так и различным способом сгруппированных выборок. На этих же преобразователях был проделан иммуноферментный анализ для однородной партии исходного экспериментального материала заданной концентрации.

Кроме того, составлены статистические выборки из сумм реальных результатов анализа и коэффициентов присоединенного к инкубированному белку измеряемого вещества в соответствующих преобразователях после анализа. Исходный статистический материал был оформлен в виде файлов с соответствующими именами, в которых указывались номера партий электродов, даты проведения анализов, что дало возможность идентифицировать статистический материал на соответствие реальному объекту.

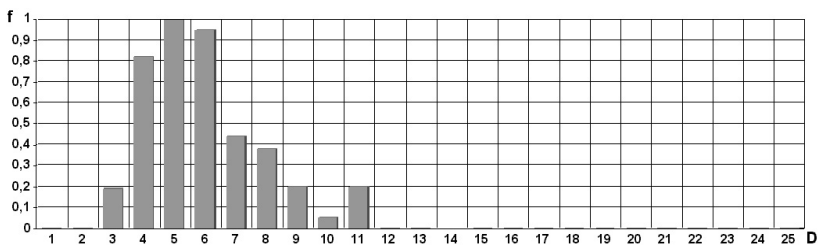
Исходные выборки были подвергнуты статистической обработке - были получены суммарные статистики, осуществлен дисперсионный и корреляционный анализ, получены и исследованы функции распределения.

### Результаты исследований

На основании исследования функций распределения структурных и глобулярных пор в материале подложки и электродов с сорбированным белком можно сделать вывод о близости распределения структурных и глобулярных пор к нормальному и отличие вторых от нормального закона распределения.



а)



б)

Рис. 3 – а - гистограмма распределения структурных и глобулярных пор в материале подложки по величине однородности, б - гистограмма распределений отношений площади с инкубированным белком к свободной площади поверхности электрода.

Эти кривые распределения наглядно демонстрируют близость к нормальному распределению пустых электродов и отдаленность от него с сорбированным белком, что подтверждается и исследованием этих выборок при помощи критерия Колмогорова - Смирнова. Кроме того, видно, что кривые распределения существенно различаются как по ширине распределения, так и по положению максимума, что указывает на случайную неоднородность.

В табл. 1 приведены суммарные статистики выборок для электродов с инкубированным белком .

Основные статистики	NAME2	NAME45	NAME25	NAME4	NAME5	NAME3	NAME6	NAME16
Объем выборки	96	192	192	96	96	96	96	192
Среднее	$38,4 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,78 \cdot 10^{-2}$	$3,72 \cdot 10^{-2}$	$3,71 \cdot 10^{-2}$	$3,83 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,76 \cdot 10^{-2}$
Медиана	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$
Мода	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$
Геометр. среднее	$3,84 \cdot 10^{-2}$	0	$3,78 \cdot 10^{-2}$	$3,72 \cdot 10^{-2}$	$3,70 \cdot 10^{-2}$	$3,81 \cdot 10^{-2}$	$3,70 \cdot 10^{-2}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$
Дисперсия	$3 \cdot 10^{-6}$	$15,7 \cdot 10^{-6}$	$4,1 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$23 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$4,6 \cdot 10^{-6}$
Стандартное отклонение	$16,66 \cdot 10^{-4}$	$34,02 \cdot 10^{-4}$	$20,36 \cdot 10^{-4}$	$20,24 \cdot 10^{-4}$	$21,87 \cdot 10^{-4}$	$48,62 \cdot 10^{-4}$	$12,14 \cdot 10^{-4}$	$21,58 \cdot 10^{-4}$
Стандартная ошибка	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$2,455 \cdot 10^{-4}$	$1,469 \cdot 10^{-4}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$	$2,23 \cdot 10^{-4}$	$4,96 \cdot 10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^{-4}$	$1,55 \cdot 10^{-4}$
Минимум	$3,5 \cdot 10^{-2}$	0	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$
Максимум	$4,4 \cdot 10^{-2}$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$7,9 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-2}$	$4,8 \cdot 10^{-2}$
Диапазон	$9 \cdot 10^{-3}$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$4,4 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Нижний квартиль	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-2}$
Верхний квартиль	$3,9 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,9 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$	$3,9 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$
Интерквартильный диапазон	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Асимметрия	0,8547	-6,3308	1,1249	1,7129	1,8957	6,4631	0,8968	2,4573
Стандартная асимметрия	3,4190	-35,8125	6,3635	6,8516	7,5831	25,8528	3,5875	13,9007
Экссесс	1,3232	73,81	1,5502	3,7471	3,8604	52,0955	0,7641	7,5348
Стандартный эксцесс	2,6464	208,766	4,3846	7,4943	7,7209	104,191	1,5282	21,3117
Погрешность неоднородности, %	3,80 %	9,19 %	5,26 %	5,41 %	5,95 %	12,89 %	3,24 %	5,79 %

На рис. 4 изображена гистограмма распределений реальных измерений при определении препаратов, содержащих наркотические вещества. Значительный разброс распределений говорит о большой неоднородности результатов реакции, а различное положение пиков говорит о разбросе сорбционной способности электродов к исследуемому антигену.

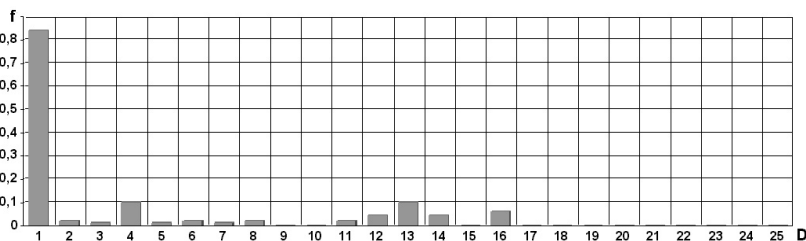


Рис. 4 – Гистограмма распределений реальных измерений иммуноферментных реакций при определении наркосодержащих препаратов.

### Анализ результатов исследования

Для оценки влияния неоднородности структурных и глобулярных пор в материале подложки на точность результатов реакции был применен F - критерий Фишера. По этому критерию сравнивались вариационные

ряды неоднородности подложки без учета неоднородности рецепторного слоя с вариационными рядами, составленными с учетом распределений отношений площади с инкубированным белком к свободной площади поверхности электрода. В табл. 2 приведены значения дисперсий для вышеупомянутых выборок.

Таблица 2

Основные статисти-ки	Без учета не-однородности рецепторного слоя	С учетом не-однородности	Без учета уче-та неоднородности рецепторного слоя	С учетом не-однородности
Объем выборки	96	96	96	96
Среднее	0.101781	0.307938	0.143094	0.284708
Медиана	0.019	0.0525	0.0535	0.07
Мода	0.013	0.051	0.042	0.061
Геометр, среднее	0	0	0	0.100738
Дисперсия	0.0947433	0.437939	0.108764	0.461776
Стандартное откл.	0.307804	0.661769	0.329793	0.679541
Стандартная ошиб-ка	0.0314151	0.0675416	0.0336594	0.0693554
Минимум	0	0	-0.048	0.036
Максимум	1.679	2.71	1.921	3.279
Диапазон	1.679	2.71	1.969	3.243
Нижний квартиль	0.013	0.032	0.042	0.0625
Верхний квартиль	0.027	0.0915	0.073	0.0815
Интеркварти, диапа-зон	0.014	0.0595	0.031	0.019
Асимметрия	3.82912	2.50327	4.04067	3.42533
Стандартная ассим.	15.3165	10.0131	16.1627	13.7013
Эксцесс	14.0659	5.11698	16.399	11.0736
Стандартный эксцесс	28.1318	10.234	32.798	22.1473
Погрешность нео-днородности, %	4.61		4.28	

Дисперсионное отношение  $F_n$  для вариационных рядов определялось по формуле [4]:

$$F_n = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (2)$$

где:  $s_1$  – большая из сравниваемых дисперсий, и сравнивалось с критическим значением  $F$  соответствующим числу степеней свободы  $\nu = 96 - 1 = 95$  для уровня значимости 0,05.

Критическое значение  $F$  для данного числа степеней свободы и уровня значимости  $F_{кр}=1,84$ . Значения дисперсий, из которых получены дисперсионные отношения для разных выборок приведены в табл. 2. Дисперсионные отношения колеблются и составляют величины 2,128; 2,462; 2,77; 2,829, что больше критического значения  $F$ . Это позволяет сделать

вывод о наличии влияния фактора неоднородности рецепторного слоя на результаты ИФА.

Всестороннее изучение источников погрешностей ИФА предполагает исследование разнообразных связей между отдельными составляющими этих погрешностей. О статистической взаимосвязи неоднородности рецепторного слоя от координат расположения неоднородных участков на активной поверхности электрода можно сделать вывод по результатам корреляционного анализа. В качестве числовой характеристики связи выбран коэффициент корреляции, который для различных электродов колеблется в пределах от 0,0381 до 0,0523. Проверка гипотезы о наличии связи неоднородности рецепторного слоя от расположения областей неоднородности на электроде по критерию Стьюдента для уровня значимости 0,05 не подтверждает предположение о статистической взаимосвязи.

Произведем расчет доверительных интервалов погрешности, связанной с неоднородностью структурных и глобулярных пор в материале подложки биосенсорных преобразователей [4]. Погрешность определяется:

$$D = \pm \frac{s_x^- \cdot 100}{X^-} \quad (3)$$

где  $s_x^-$  – стандартное отклонение математического ожидания;  
 $X^-$  – математическое ожидание.

В табл. 1 приведены значения погрешностей в процентах. Как видно из табл. 1, ошибка для биосенсорных информационно-измерительных систем контроля наличия наркотических веществ в анализируемых пробах достигает 15%. Таким образом, очевидна необходимость технологического контроля однородности подложек биосенсорных электродов для уменьшения дополнительной погрешности ИФА, что позволит повысить достоверность результатов анализов как положительных, так и отрицательных, поскольку без такого технологического контроля по результатам иммуноферментной реакции трудно судить о количественных параметрах связывания. В то же время повышение достоверности результатов ИФА и требование стандартизации ИФА требуют минимальной вариации свойств как партии электродов для одного специфического анализа, так и между партиями электродов для анализа других типов реакции.

Математическая обработка экспериментальных данных производилась при помощи пакета математических и графических процедур “STATGRAF”.

### Выводы

1. Точность проведения иммуноферментного анализа зависит от нескольких факторов, в числе которых значительную роль играет неоднородность распределения структурных и глобулярных пор в материале подложки биосенсорного электрода. Погрешность, вносимая этим фактором, достигает 15 %.

2. Вариабельность результатов иммуноферментной реакции можно уменьшить, учитывая при использовании биосенсорных электродов неоднородность сенсорного слоя электродов с сорбированным белком.

### Литература

1. Иммунохимия в клинической лабораторной практике. // Под ред. А. М. Урда, Дж. Т. Уичера. / Пер. с англ., Москва, “Медицина”, 1981. – 412 с.
2. Пантелеев О.А., Ванеева Л. И. Непрямой твердофазный метод иммуноферментного анализа, его точность и источники погрешностей. // В журн. “Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии”, 3, / Москва, “Медицина”. 1986 г. – С 72-88.
3. Твердофазный иммуноферментный анализ. // Сборник научных трудов, - Л., / Изд. Института им. Пастера, 1988. 211 с.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. - М., “Статистика”, 1976. 334 с.
5. Евтеева Л.П., Кошелев А.П., Шульгин Л.И. Некоторые аспекты повышения точности иммуноферментного анализа. // Информационные технологии: Сб. трудов вып 2 / НИПКИ “Искра”, Луганск, 1999. – С 89-97.