

# Контроль линейности иммуноферментных планшетных анализаторов

**О. Б. Кострова**, ген. директор ООО «Тензотрем».

**И. Б. Ландау**, ген. директор ООО «Метромед».

**Л. М. Муравник**, ген. директор ООО «Техноскан»

**Н. М. Сафьянников**, доцент, к. т. н, Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», ген. директор ООО «ЛЭТИНТЕХ»

## Linearity control for eia microplate analyzers

### Резюме

Иммуноферментные исследования являются одним из наиболее известных методов выявления тяжелых заболеваний, таких как ВИЧ-СПИД, гепатит, наркомания, грипп и пр. Достоверность диагностики напрямую зависит от стабильности точностных характеристик иммуноферментных анализаторов (ИФА), используемых в процессе исследований. Важнейшая характеристика ИФА — линейность измерительного тракта. В статье предлагается метод и средство контроля линейности, основанные на применении твердотельных градуировочных светофильтров, которые не аттестуются эталонными средствами. Градуировочным параметром является толщина светофильтров, которая измеряется с необходимой точностью рутинными рабочими средствами измерения. Применение метода обеспечивает контроль линейности измерительного тракта современных высокоточных ИФА.

Ключевые слова: иммуноферментные анализаторы, достоверность диагностики, линейность измерительного тракта, контроль линейности, градуировочные светофильтры.

### Summary

Enzyme immunoassay is one of the best known methods of detection of such serious diseases as HIV/AIDS, hepatitis, drug addiction, influenza and so on. Reliability of diagnostics directly depends on metrological characteristics' stability of analyzers for enzyme immunoassay (EIA) that are used in the process of analysis. The most important characteristic of EIA is measuring path linearity. In the article the method and means for the linearity control are offered that are based on the use of solid-state calibration light filters which cannot be certified with standard means. It is light filters' thickness that serves as calibration parameter, and it is being measured with the necessary accuracy with routine working measuring instruments. Application of the method provides linearity control of measuring path of modern high precision EIA instruments.

Keywords: analyzers for enzyme immunoassay, reliability of diagnostics, measuring path linearity, linearity control, calibration light filters.

Иммуноферментные исследования являются в настоящее время одним из наиболее известных диагностических методов выявления большого ряда патологий, в связи с чем в клинико-диагностических лабораториях наблюдается значительный рост общего количества и номенклатуры фотометрических приборов для иммуноферментного анализа. При этом наиболее широко распространены иммуноферментные анализаторы планшетного типа, чаще всего применяющиеся при массовых мониторинговых обследованиях, направленных на обнаружение тяжелых заболеваний, таких как ВИЧ-СПИД, гепатит, наркомания, грипп различных модификаций и пр.

Выявление иммуноферментным методом особо опасных патологий требует усиленного контроля диагностической достоверности результатов анализов. Медицинская лабораторная практика показывает, что достоверность диагностики напрямую зависит от стабильности точностных характеристик фотометрических анализаторов, используемых в процессе проведения исследований.

Парк иммуноферментных планшетных анализаторов, используемых в клинико-диагностических лабораториях России и стран СНГ, очень широк и состоит из полуавтоматических и автоматических приборов как отечественного, так и зарубежного производства.

В соответствии с законодательством России, все иммуноферментные планшетные анализаторы, как средства измерения медицинской техники, подвергаются ежегодной государственной поверке, в процессе которой проверяются их метрологические характеристики, заданные систематической и случайной погрешностью.

В целях предотвращения появления недостоверной информации, вызванной нарушениями работоспособности приборов в межповерочный период эксплуатации, необходимо осуществлять регулярный контроль основных технических характеристик, влияющих на результаты измерения. В статье [1] сообщалось о разработанном нами и серийно выпускаемом средстве, которое позволяет осуществлять регулярный контроль основных харак-

теристик планшетных анализаторов силами медицинского персонала без привлечения технических служб. Указанное средство обеспечивает контроль правильности работы прибора в качестве измерителя оптической плотности путем проверки временной воспроизводимости результатов измерения в рабочем диапазоне оптической плотности на используемых длинах волн.

Однако в лабораторных исследованиях в большинстве случаев используются методы расчетов по градуировочным характеристикам, а не по абсолютному значению оптической плотности, при этом важнейшей характеристикой иммуноферментных анализаторов является *линейность* измерительного тракта, которая определяется отклонением реальной градуировочной характеристики от идеальной. Анализ технических характеристик иммуноферментных анализаторов (ИФА), использующихся в клинико-диагностических лабораториях, показал, что большинство приборов зарубежного производства обязательно указывают в списке основных характеристик *ли-*

нейность измерительного тракта, которая является определяющим критерием точности проведения иммуноферментных исследований. Несмотря на то, что российские стандарты по метрологии не включают линейность в перечень нормированных характеристик [2], представляется целесообразным проведение в процессе эксплуатации проверки линейности измерительного тракта, как одной из важнейших характеристик иммуноферментных анализаторов. Известны приспособления для градуировки и контроля линейности ИФА, поставляемые зарубежными производителями для ряда анализаторов собственного производства, состоящие из набора стрипов с предварительно внесенными в них красителями. Тип красителя выбран в соответствии с проверяемым рабочим спектральным диапазоном анализатора. В процессе изготовления растворы красителей с необходимыми разведениями тщательно отдозированы в лунки стрипов, и на эталонном приборе определены значения их оптической плотности. После чего стрипы высушены и упакованы. После добавления одинакового количества воды в лунки градуировочных стрипов образуется ряд цветных растворов с известным соотношением их концентраций. При тестировании калибровочные стрипы с растворами помещают в кюветное отделение анализатора, градуируют его по одному из растворов и производят тестовые измерения, позволяющие оценить линейность измерительного тракта.

Технология изготовления таких средств позволяет контролировать линейность анализаторов, имеющих характеристику линейности не менее чем 1,5%, и диапазон измерения оптической плотности, верхняя граница которого не превышает 2,0 Б.

Применение градуировочных стрипов связано с необходимостью дополнительных операций пробоподготовки, требующих определенной квалификации персонала: заполнения лунок контрольного стрипа жидкостью, герметизации для предотвращения испарения, временной выдержки, перемешивания. Перечисленные операции требуют значительных временных затрат и особой тщательности, так как малейшее нарушение технологии пробоподготовки приводит к неисправимому браку кон-

трольного стрипа с необходимостью его замены и повторения всех операций. Градуировочные стрипы являются средством одноразового использования, так как фотометрические характеристики растворов красителя являются стабильными непродолжительное время. Из-за незначительного срока службы подготовленного контрольного стрипа с растворами длительный мониторинг технических характеристик анализаторов, позволяющий выявлять их отказы на ранней стадии возникновения, не может быть проведен на одном и том же контрольном стрипе. Кроме того, необходимость использования значительного количества стрипов при регулярном контроле анализаторов приводит, ввиду их высокой стоимости, к ощутимым финансовым затратам. Совокупность недостатков средства контроля линейности в виде градуировочных стрипов ограничивает их широкое внедрение в медицинскую практику для регулярного контроля линейности широкого ряда ИФА-анализаторов.

Именно поэтому мы считаем целесообразным использование в качестве градуировочных элементов твердотельных светофильтров с различной оптической плотностью. Важным достоинством светофильтров является значительное упрощение процесса тестирования анализаторов благодаря замене растворов красителей твердотельными имитаторами. При их использовании отсутствуют длительные и трудоемкие операции пробоподготовки и исключаются технологические процессы, приводящие к неисправимому браку. Еще одним из достоинств твердотельных светофильтров является возможность проверки параметра линейности измерительного тракта в более широком диапазоне оптической плотности. Твердотельные светофильтры имеют неограниченный срок службы и являются средством многократного использования, благодаря чему значительно уменьшаются финансовые затраты на проведение систематического контроля ИФА-анализаторов.

Для обеспечения проверки линейности ИФА с помощью градуировочных светофильтров необходимо предварительно определить их оптическую плотность (аттестовать) с помощью эталонных средств измерения. Эталон-

ные средства измерения не являются серийной продукцией, в основном принадлежат организациям Росстандарта. Проведение измерений на эталонных установках является дорогостоящей процедурой и недоступно широкому кругу пользователей. Кроме того, получаемая точность проверки линейности ИФА градуировочными светофильтрами возможна только для ИФА, имеющих характеристику линейности порядка (3–5)%, что хуже, чем при использовании градуировочных стрипов с растворами красителей. Невысокая точность контроля линейности обусловлена метрологическими возможностями эталонных средств измерения, имеющихся в организациях Росстандарта.

Из-за низкой точности аттестованные по оптической плотности градуировочные твердотельные светофильтры практически неприменимы для метрологически корректного контроля линейности парка иммуноферментных анализаторов, используемых медицинскими клинико-диагностическими лабораториями в настоящее время.

Нами был разработан метод проверки линейности измерительного тракта ИФА-анализаторов, основанный на применении твердотельных светофильтров, которые не требуют аттестации по оптической плотности.

Сущность метода состоит в том, что в процессе проверки линейности для градуировки тестируемого анализатора используются не известные концентрация растворов красителей или оптическая плотность аттестованных светофильтров, а предварительно измеренная толщина твердотельных поглощающих образцов.

Правомерность метода подтверждается законом Бугера-Ламберта-Бэра [3], математическое выражение которого имеет следующий вид:

$$D = \xi \cdot C \cdot \ell,$$

где  $D$  — оптическая плотность раствора красителя;  $\xi$  — удельный (молярный) показатель поглощения красителя, рассчитанный на единичную концентрацию;  $C$  — концентрация красителя в растворе;  $\ell$  — толщина слоя раствора.

Как видно из приведенной формулы, при  $\xi = \text{const}$  для градуировки возможно применение любого из параметров:  $D$ ,  $C$ ,  $\ell$ .

При проведении контроля линейности тестируемый прибор градуируется по оптическим элементам с минимальной и максимальной толщиной градуировочного светофильтра.

При этом получают следующие значения:  $R_0$  — значение регистрируемой анализатором величины при установке градуировочного светофильтра «0» ( $\ell_0$ );  $R_n$  — значение регистрируемой анализатором величины при установке оптического элемента «n» ( $\ell_n$ ).

Тогда расчетное значение регистрируемой величины  $R_i$  для  $i$ -го градуировочного светофильтра, полученное для расчетной (линейной) зависимости  $R$  от  $\ell$ , будет определяться по следующей формуле:

$$R_{\text{расч}} = \frac{R_n - R_0}{\lambda_n} \lambda_i$$

где  $\ell_i$  — значение толщины  $i$ -го градуировочного светофильтра.

Реальная зависимость результата измерения образцов от их толщины  $R_{\text{изм}}(\ell)$  строится по результатам измерения градуировочных светофильтров набора с номерами от «1» до «n-1» на тестируемом ИФА.

На рисунке 1 приведены расчетная (1) и реальная (2) зависимости регистрируемой величины от толщины образцов  $R(\ell)$ .

Линейность измерительного тракта анализатора характеризуется отклонением  $\Delta R$  реальной градуировочной характеристики от идеальной и может быть представлена как в абсолютных, так и в относительных единицах.

Разработанный метод обладает следующими достоинствами:

- используются простые в эксплуатации, долговечные и экономичные твердотельные градуировочные элементы;
- градуировочный параметр (толщина) измеряется с достаточно высокой точностью (погрешность измерения толщины градуировочных светофильтров от 0,15 до 0,3% обеспечивается рутинными рабочими средствами измерения без эталонных средств);
- контролируется линейность измерительного тракта современных высокоточных анализаторов (0,5–1)%.

Для технической реализации метода необходимо изготовление ряда твердотельных поглощаю-

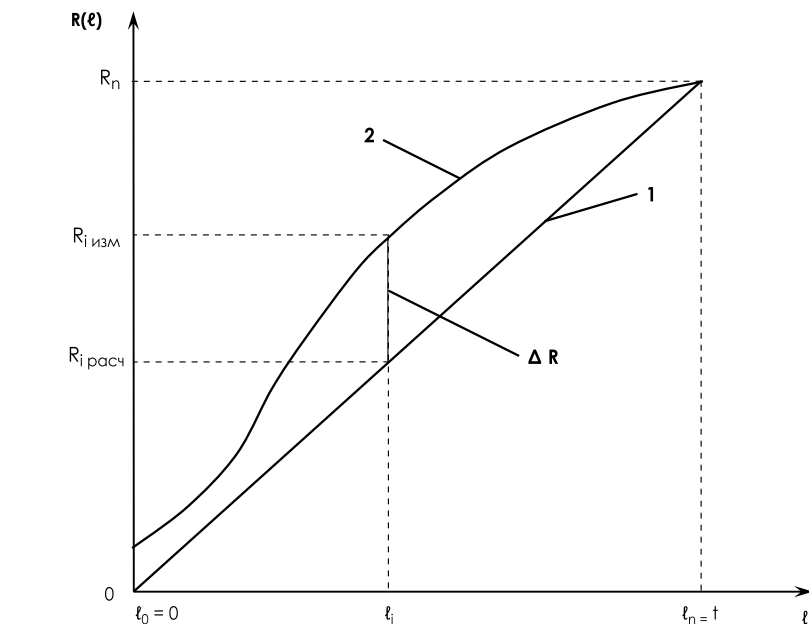


Рис. 1. Принцип определения линейности измерительного тракта.

1 — расчетная зависимость регистрируемой величины от толщины образцов  $R(\ell)$ .  
2 — измеренная зависимость регистрируемой величины от толщины образцов  $R(\ell)$ .  
 $\Delta R$  — линейность измерительного тракта ИФА

щих светофильтров с оптической плотностью в рабочем диапазоне ИФА-анализаторов, толщина которых измерена с необходимой точностью. В серийно выпускаемом средстве для контроля основных характеристик планшетных анализаторов в процессе эксплуатации, описанном в предыдущей статье [1], имеются светофильтры, оптическая плотность которых соответствует рабочему диапазону ИФА. Однако поскольку указанное средство изначально не предназначалось для проверки линейности, его светофильтры, во-первых, не нормировались по значению толщины, во-вторых, для минимизации разброса толщин светофильтров, оптическая плотность которых распределена внутри рабочего диапазона ИФА, они изготавливались из стекол различных марок с разными коэффициентами поглощения ( $\zeta \neq \text{const}$ )

Таким образом, для расширения функциональных возможностей имеющегося средства в части проверки линейности измерительного тракта ИФА была откорректирована конструкция светофильтров таким образом, чтобы их характеристики обеспечивали проверку линейности, позволяя при этом выполнять все ранее предусмотренные функции.

На разработанный метод и его техническую реализацию органи-

зацией ООО «Метромед» получен патент РФ № 2362129 (приоритет от 29.12.2007 г.) [4].

На базе патента откорректирована конструкторская документация светофильтров ранее выпускаемого изделия «Комплект приспособлений для проверки основных характеристик иммуноферментных анализаторов планшетного типа в процессе эксплуатации КПА-01».

В настоящее время подготавливается производство комплекта КПА-01 с расширенными функциональными возможностями, позволяющего дополнительно проводить проверку линейности с высокой точностью, что обеспечивает контроль одного из важнейших технических параметров даже тех ИФА-анализаторов, погрешности которых являются предельно достижимыми в настоящее время.

#### Список литературы

1. Внутривлабораторный контроль качества фотометрических медицинских анализаторов/О.Б. Зудилина, О.Б. Кострова, И.Б. Ландау, Н.М. Сафьянников — Москва.: ООО «Альфавит», «Медицинский алфавит. Современная лаборатория», №2, 2012 — с. 53–56.
2. «Нормируемые метрологические характеристики средств измерений»/ГОСТ 8.009–84.
3. Медицинские лабораторные фотометрические приборы и комплексы/А.Н. Алипов, Л.М. Муравник, Н.Л. Ронжина, Н.М. Сафьянников; под ред. Н.М. Сафьянникова. — СПб.: Реноме, 2010. — 504 с.
4. «Планшет для тестирования иммуноферментных анализаторов»/О.Б. Кострова, И.Б. Ландау, Л.М. Муравник, И.Н. Сафьянников — Патент РФ, Бюл. № 20, 2009.

