

МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Н.В. Свежова, В.Е. Шаркова, Д.Б. Громов, В.А. Головаченко, Д.Г. Полынцев

ЗАО «Алкор Био», Санкт-Петербург

Представляемая вашему вниманию статья посвящена вопросам математической обработки данных иммуноферментного анализа (ИФА). Статья состоит из двух частей. Первая часть содержит краткое сравнительное описание основных способов представления экспериментальных данных и построения калибровочной кривой (КК), а также практические рекомендации по выбору математических методов расчета концентраций. Предлагаемые во второй части статьи рекомендации базируются на сравнительном исследовании фотометрического оборудования и программного обеспечения (ПО), наиболее широко используемого в российских клинических лабораториях при проведении ИФА-диагностики. В эксперименте, имитирующем конкурентный анализ, проиллюстрирована зависимость получаемого клинического результата от выбора того или иного способа построения калибровочного графика на основе оптических плотностей калибровочных проб. Представленные результаты исследования показывают, что неправильно выбранный метод обработки данных может приводить как к ложной выбраковке всего проведенного анализа на основании ошибочного расчета концентрации аналита в контрольной сыворотке, так и к ложной диагностике на основании ошибочного расчета концентрации аналита в пробе пациента вблизи точки принятия медицинского решения.

Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе.

Теоретические основы

Иммуноферментный анализ достаточно прост в исполнении. Тем не менее, в его основе лежат сложные биологические и физико-химические процессы, влияющие на характер получаемых данных и накладывающие определенные ограничения на применимость методов математической обработки результатов.

ИФА реализуется в двух основных модификациях: конкурентный метод и сэндвич-метод. Определение концентрации аналита в лунках планшета проводится спектрофотометрическим методом.

Сэндвич-ИФА используется для определения крупных антигенов, содержащих, по крайней мере, две антигенных детерминанты (эпитопа). При отсутствии лимитирующих факторов в сэндвич-анализе в рабочем диапазоне метода должна существовать прямая линейная зависимость между величиной сигнала и концентрацией аналита в пробе. Однако, из-за ограниченных количеств антител, сорбированных на твердой фазе, антител,

конъюгированных с ферментом, субстрата ферментативной реакции, а также из-за ограниченного рабочего диапазона спектрофотометра реальные кривые сэндвич-анализов могут иметь в разной степени искаженный вид (Рис. 1А). При помощи конкурентного ИФА определяют антигены небольшой молекулярной массы с единственным эпитопом. В таком анализе количество метки (конъюгированный с ферментом аналит), связавшейся с антителами на твердой фазе и, следовательно, величина сигнала имеет обратную зависимость от концентрации свободного аналита в пробе (Рис. 1Б). Зависимость величины регистрируемого сигнала от концентрации аналита при проведении ИФА практически всегда имеет в той или иной степени нелинейный характер. Причины этого кроются в природе анализа.

ИФА имеет целью определение концентрации искомого аналита в пробах пациентов. Для этого на основании оптических плотностей калибровочных проб и присвоенных им концентраций должна быть построена калибровочная кривая (КК).

Краткий обзор методов построения калибровочной кривой

Процесс построения КК представляет собой задачу аппроксимации зависимости оптической плотности от концентрации аналита в пробе. Термин аппроксимация означает приближение одной зависимости к другой по тому или иному правилу. Предположим, что нам известна зависимость регистрируемого сигнала от концентрации аналита в отсутствие всех неконтролируемых факторов и ошибок – идеальная теоретическая КК. В реальном эксперименте КК всегда отличается от «истинной» вследствие прямых ошибок и влияния меняющихся факторов окружения на оптические плотности калибровочных проб и проб пациентов. Поэтому, говоря о точности построения КК, мы имеем в виду, что, чем точнее построена КК, тем ближе она к неизвестной нам «истинной» природной зависимости. Нахождение приближенных значений функции в промежутках между точками с известными ее значениями называют интерполяцией. С интерполяцией мы сталкиваемся тогда, когда строим КК таким образом, чтобы все калибровочные точки лежали на ней. Частным случаем интерполяции является экстраполяция. С экстраполяцией мы имеем дело в случае, когда нужно определить концентрацию аналита в пробе, оптическая плотность продукта ферментативной реакции в которой выше, чем в калибровочной пробе (КП) с максимальной ОП или ниже, чем в КП с минимальной ОП.

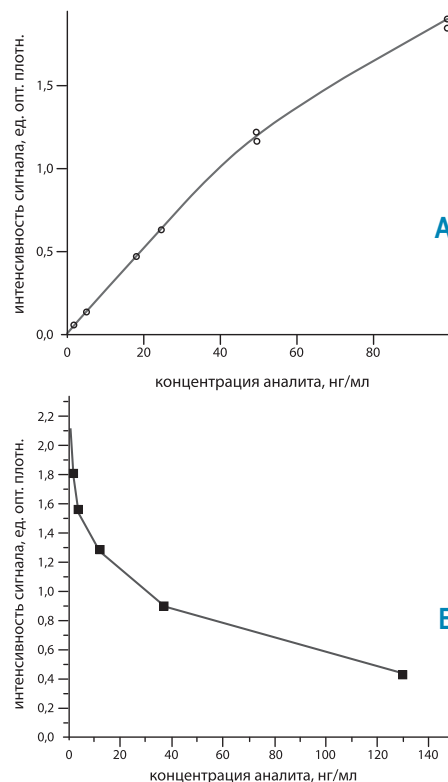


Рис. 1 График зависимости интенсивности сигнала от концентрации аналита в наборе калибровочных проб для типичного сэндвич-ИФА (А) и типичного конкурентного ИФА (Б)

При экстраполяции значения концентрации аналита, полученные по КК, построенным разными методами, могут различаться очень существенно. Экстраполяции выше значения последней калибровочной пробы можно избежать, разводя анализируемую сыворотку таким образом, чтобы ее значение попадало в динамический диапазон анализа. Однако этим способом можно пользоваться только при условии, что в инструкции к набору разрешается разводить сыворотки, т.е. выполняется линейность определяемых при серийном разведении концентраций аналита. Экстраполяция ниже первой калибровочной точки должна считаться ошибкой, даже если программное обеспечение позволяет ее осуществлять, и исключаться из анализа. На практике встречаются случаи, когда программа выдает отрицательные значения концентрации аналита, что противоречит природе вещей и здравому смыслу.



ИЗДАТЕЛЬСТВО
ОТРАСЛЕВЫЕ
СПРАВОЧНИКИ

(812) 740-71-04, 740-71-05
www.vita-lab.spb.ru

ИНДИКАТОРЫ для контроля холодовой цепи "ТЕРМОТЕСТ" (Россия), ИНДИКАТОРЫ стерилизации "БИОСТЕР" (Россия), салфетки и гели "Колетекс", диагностические наборы и реагенты, расходные материалы и оборудование для лабораторий.

ООО «ВитаЛаб»

Методы описания зависимости между набором концентраций КП и соответствующих им значений оптических плотностей можно разделить на эмпирические, в которых не делается никаких предварительных предположений о природе искомым зависимости, т.е. о виде калибровочной кривой, и методы, основанные на теоретических предположениях о том, к какому семейству должна принадлежать функция, описывающая КК (7). Для построения КК используют два основных подхода – «ручной», с использованием графических построений, либо методы с применением компьютерных вычислений.

Рассмотрим «ручной» подход к построению КК. В эпоху до широкого распространения компьютерной техники КК, как правило, строили вручную, с помощью миллиметровой бумаги, карандаша и линейки (либо гибкого лекала). Затем по КК графически определяли концентрации аналита в сыворотках. Хотя в рутинной лабораторной практике ручное построение КК в настоящее время практически не применяется, мы рассмотрим здесь его особенности, важные для понимания работы ПО.

Если бы в ИФА существовала линейная зависимость величины сигнала от концентрации во всем диапазоне измерения, то это позволило бы избавиться от многих проблем, в том числе и от субъективности при построении КК «ручным» способом. Для визуального расширения линейной области графика и последующего упрощения процедуры «рисования» графика применяют различные преобразования осей. Подобные преобразования называются линеаризующими (2). Форму кривой можно модифицировать, меняя масштаб концентраций антигена, откладываемых по оси абсцисс. Масштаб может быть линейным (Рис. 2А) или логарифмическим (Рис. 2Б). Линейный масштаб используется обычно при определении концентрации измеряемого вещества в узком диапазоне. В широком диапазоне, при изменении концентрации антигена в калибровочных пробах более чем на один порядок, лучше использовать логарифмическую шкалу. В случае сэндвич-анализа логарифмического

преобразования может быть достаточно для линеаризации КК.

По оси ординат также могут откладываться разные величины: непосредственно регистрируемый сигнал (оптическая плотность раствора после остановки ферментативной реакции), его логарифм, отношение концентрации свободного аналита к концентрации связанного в арифметической или логарифмической формах или результаты специальных сложных преобразований, о которых будет рассказано далее. Примером такого специального линеаризующего преобразования служит предложенное Родбардом преобразование $\text{logit}(9)$.

На Рисунке 2 приведены КК конкурентного анализа, для построения которых использованы оригинальные данные, а также различные сочетания их преобразований. В случае конкурентного анализа графиком безо всяких математических преобразований переменных (Рис. 2А) сложно пользоваться из-за большой «крутизны», затрудняющей точное геометрическое определение низких концентраций аналита. Если использовать для построения оригинальные значения сигнала и натуральные (или десятичные) логарифмы концентраций, часто удается добиться существенной линеаризации калибровочного графика (Рис. 2Б). Увеличивается точность считывания низких концентраций аналита, т.к. эта область графика как бы «растягивается». Тем не менее, на концах кривой все еще может наблюдаться отклонение от линейности. Такой способ (как и все способы, где на график наносится логарифм концентрации) имеет существенный недостаток: в точке «0» логарифмическая функция не определена, поэтому использовать калибровочную пробу с нулевой концентрацией для построения КК невозможно. Следовательно, при необходимости определять концентрации в нижней части динамического диапазона, в наборе калибраторов должна присутствовать калибровочная проба с концентрацией, близкой к нулю. Для преодоления этой проблемы в алгоритме ПО может быть заложено искусственное присвоение КП с нулевой концентрацией аналита сверхмалого номинала, например 10⁻⁶.

Построение графиков для конкурентных анализов и сравнение различных анализов упрощается, если представить данные следующим образом: из оригинальных значений сигнала предварительно вычесть среднюю величину фонового сигнала (неспецифического связывания) и представить полученные значения в виде десятичной дроби от среднего значения сигнала в калибровочной пробе «0». Если точная величина фонового сигнала неизвестна, ее принимают равной нулю. Обработанные таким образом оригинальные данные обозначают B/B_0 , либо g . Для переменной g можно в дальнейшем применить преобразование logit :

$$\text{logit}(r) = \ln [(1 - r)/r]$$

Когда по оси Y наносится $\text{logit}(r)$; а по оси X – натуральный логарифм концентрации, построенный таким образом график называют преобразованием logit/\log (Рис. 2В). При этом преобразовании калибровочный график часто, хотя и не всегда, преобразуется в практически прямую линию. На таком графике возможные погрешности отдельных калибровочных проб обнаруживаются при визуальной оценке качества КК значительно легче (4).

Из-за существенных затрат времени для ручного построения КК ныне почти повсеместно применяются компьютерные программы. Существенным недостатком ручного построения является субъективность интерполяции. Достоинство ручного построения КК состоит в том, что, в отличие от компьютерного построения, оно не имеет погрешности, вызванной ограничениями математической модели, либо недостаточной адекватностью метода вычисления.

Процедуры, применяемые при построении калибровочных графиков вручную, разобраны столь подробно потому, что ПО, применяемое для обработки результатов ИФА, при построении КК позволяет выполнять те же операции. Если при построении графика вручную, линеаризация данных необходима в первую очередь для более точной интерполяции, то при компьютеризованном вычислении целью линеаризации становится, преимущественно, лучшая визуализация КК для последующей оценки ее пригодности при выполнении рутинного внутрилабораторного контроля качества клинических анализов.

Методы оценки полученных зависимостей сигнала от концентрации аналита можно разделить на эмпирические, в которых не делается никаких предварительных предположений о природе искомым зависимости, и теоретические методы, основанные на теоретических предположениях о том, к какому семейству должна принадлежать функция, описывающая калибровочную кривую (7). С этой точки зрения ручное построение КК правильнее отнести к категории эмпирических методов.

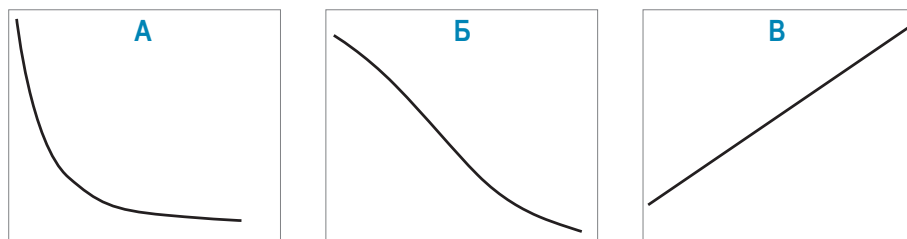


Рис. 2. Форма калибровочного графика в конкурентном анализе.

А и Б: по оси Y отложена интенсивность сигнала. А: по оси X – концентрация аналита,

Б: по оси X – натуральные логарифмы концентраций аналита,

В: по оси X – натуральный логарифм концентрации, по оси Y – $\text{logit}(r)$.

Для каждой калибровочной пробы нанесены как значения сигнала в отдельных репликатах, так и среднее значение сигнала.

Как уже указывалось, эмпирический метод построения КК, как правило, не предполагает существования некой единой функции, описывающей зависимость сигнал-концентрация, единственным требованием является соединение точек непрерывной гладкой линией. Провести линию можно строго через все калибровочные точки или между ними, сглаживая в той или иной степени естественный разброс данных в реальном анализе. Такой подход зачастую выражается в том, что разные участки КК описываются разными функциями. Так, при простой линейной интерполяции от точки к точке, средние значения сигнала для соседних калибровочных проб соединяются отрезками прямой с разными углами наклона; а сплайн представляет собой функцию, составленную из «кусков» многочленов одного порядка, но с разными коэффициентами, «сшитых» в узлах по производным нескольких порядков.

Примерами эмпирического подхода, реализуемыми в ПО, могут служить интерполяция полиномами (=многочленами) и сплайнами.

При интерполяции полиномами (полиномиальная регрессия) происходит подбор и степени многочлена, и коэффициентов при степенных членах эмпирического уравнения регрессии. При задании вручную порядка многочлена (квадратичный или кубический полином) программа осуществляет только подбор коэффициентов. Наиболее распространенным способом выбора наиболее приемлемого уравнения является метод наименьших квадратов. Линейная регрессия первого порядка (аппроксимация прямой линией) является частным случаем такой интерполяции. Ее можно применить, если экспериментальные данные образуют прямую зависимость или их удалось линеаризовать, например, с помощью $\log\text{it-log}$ преобразования (4).

Интерполяция сплайнами является частным случаем интерполяции полиномами. Например, кубическая сплайн-функция – это группа сопряженных кубических многочленов, в местах сопряжения которых, первая и вторая производные непрерывны. Для обработки данных ИФА применяются интерполяционные и сглаживающие сплайны (1,3). Интерполяционные сплайны представляют собой гладкую кривую, проходящую через все заданные точки. Использование интерполяционных сплайнов при обработке результатов целесообразно только в случае высокой точности проведения эксперимента. Однако разброс экспериментальных значений обычно получается достаточно большим. В этих условиях интерполяционные сплайны воспроизводят все причудливые осцилляции, обусловленные случайными погрешностями. В результате искажается вид изучаемой зависимости и затрудняется интерпретация результатов эксперимента. Более целесообразным представляется подход, основанный на процедуре сглаживания, призванный уменьшить элемент случайности

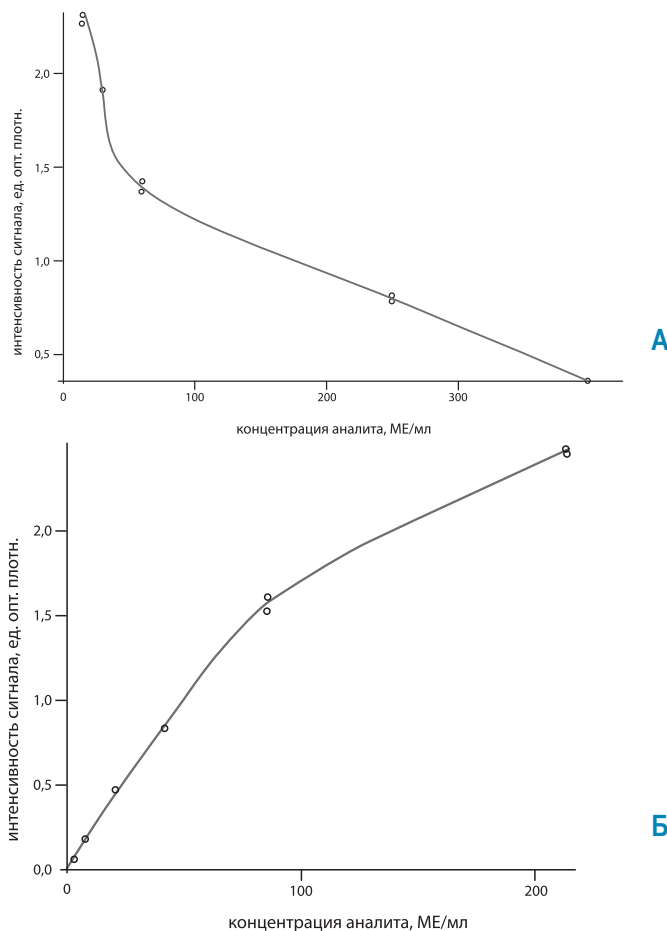


Рис. 3 Пример построения КК конкурентного анализа (А) и сэндвич-анализа (Б) методом кубического сплайна.

в результатах измерений. Для этой цели используются сглаживающие сплайны.

Следует избегать применения сплайн-интерполяции в тех случаях, когда характер изменения сигнала в конкретном анализе имеет тенденцию к нерегулярности или немонотонности. На Рисунке 3 отчетливо видны колебания, возникающие в тех местах КК, где нарушена монотонность в расположении точек. Повторимся, что причиной осцилляций калибровочного графика является ограничение, присущее всем эмпирическим методам: слишком большое значение придается «точности попадания» значения сигнала на кривую. Тогда случайное отклонение в положении одной калибровочной пробы приводит к систематической погрешности в определении концентрации аналита в пробах пациентов в области этого калибратора.

Все теоретические методы построения КК основаны на том, что природа зависимости сигнала от концентрации аналита считается известной и может быть выражена в математической форме. За счет этого можно частично скорректировать ошибки в исходных данных конкретного анализа, поскольку математическое представление кривой резко ограничивает число возможных конфигу-

раций, которые эта кривая может принимать (7). Недостатком метода является то, что математические модели основаны на упрощенных молекулярно-кинетических схемах иммуноанализа. Тем не менее, в большинстве случаев эти методы представляют собой наилучший алгоритм построения калибровочных графиков.

Наиболее корректными считаются в настоящее время такие теоретические методы построения калибровочного графика, как теоретическая 4-параметрическая логарифмическая логистическая модель (4PL) и преобразование $\log\text{it-log}$, являющееся частным случаем 4PL (6). Четыре параметра, оценивающиеся в модели 4PL при построении КК в конкурентном анализе, – это средний уровень сигнала для бесконечной дозы (фоновый сигнал); средний уровень сигнала для «0» концентрации аналита; отрезок, отсекаемый прямой на оси Y и угловой коэффициент прямой (см. Приложение 1, 2; Рис. 5). Развитием модели 4PL стала 5-параметрическая логистическая модель (5PL), где добавляется еще пятый параметр, характеризующий степень асимметрии кривой. В Приложениях 1 и 2 модели 4PL и 5PL рассмотрены более подробно, показана их связь с преобразованием $\log\text{it-log}$.

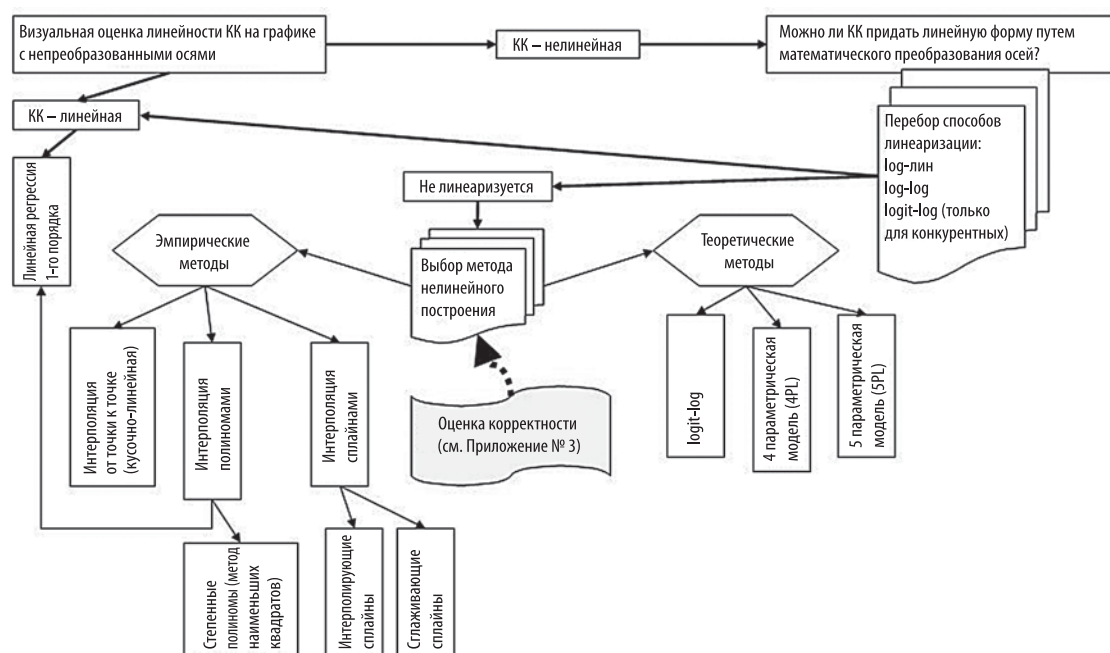


Рис. 4 Классификация методов построения калибровочной кривой в ИФА, представленная в графическом виде. Жирными стрелками показан алгоритм выбора метода построения КК. Объяснения в тексте

Взаимосвязь математических методов обработки данных ИФА представлена в виде блок-схемы на Рисунке 4.

Подбор подходящего метода построения КК требует определенного навыка и поэтому находится, как правило, в компетенции разработчиков ИФА-наборов. Оптимальный для данной ИФА-системы метод математического анализа данных должен быть описан в инструкции к набору. В тех случаях, когда инструкция такой информации не содержит, пользователь вынужден самостоятельно выбрать метод расчета концентраций. Необходимо понимать, что используемые при проведении ИФА ридеры предназначены зачастую для измерения ОП в очень разных исследованиях (биохимия, молекулярная биология), следовательно, не все алгоритмы расчетов, как эмпирические, так и теоретические, в имеющемся ПО пригодны для обсчета данных именно ИФА. Чем больше возможностей ПО, тем лучше пользователь должен разбираться в том, какая программа подходит к его типу экспериментов. Подбирая программу из списка представленных следует ограничиться только теми, которые перечислены в данной статье, по возможности, отдавая предпочтение теоретическим методам – производным модели 4 PL.

Однако при подборе следует учитывать, что компьютерные методы обработки данных ИФА, и эмпирические и теоретические, могут производить неадекватные построения. Причиной этого может быть, кроме прочего, некорректная реализация использованных в программе алгоритмов, поэтому полученные тем или иным способом калибровочные графики перед началом рутинного использования выбранного метода обсчета

необходимо проверять на адекватность. Процедура проверки представляет собой обратный расчет значений калибраторов по их сигналам с использованием уравнения аппроксимирующей КК и сравнение с предварительно заданными значениями этих калибраторов (См. Приложение 3). Чем ближе вычисленные значения КП к заданным производителем концентрациям, тем точнее и адекватнее метод построения КК. Проверка возможна только в тех случаях, если ПО анализатора может проводить эту процедуру самостоятельно или позволяет вводить ОП калибраторов вручную. Этот способ проверки адекватности алгоритма расчета данных ИФА бессмысленно применять в случае использования для построения КК кусочно-линейной аппроксимации и интерполяционных сплайнов, так как непременным условием построения КК этими методами служит ее прохождение через все точки; следовательно рассчитанные концентрации калибраторов всегда будут равны заданным производителем.

Далее в статье будет показано, что методы математической обработки данных играют в иммуноанализе не менее важную роль, чем способ подготовки образцов или точность пипетирования, и могут вносить ничуть не меньший вклад в получение ложных результатов, если будут подобраны неверно.

Рекомендации по выбору метода расчета КК

В процессе выбора и оценки пригодности метода расчета руководствуйтесь алгоритмом, представленным на Рисунке 4. Вне зависимости от того, какая программа и по каким причинам

выбрана, она должна пройти проверку на корректность реализации алгоритма расчета (см. Приложение 3).

Если калибровочный график имеет линейную форму непосредственно при нанесении оригинальных значений, или графику можно придать линейную форму с помощью математического преобразования переменных, допускается применять линейный метод построения (линейные, полулогарифмические, логарифмические или logit-logosi в сочетании с линейной регрессией или кусочно-линейной интерполяцией). В противном случае, необходимо нелинейное построение (4, 7, 12).

Эмпирические методы построения КК представлены в любом ПО достаточно широким списком. Однако они могут адекватно использоваться только в условиях высокой точности и воспроизводимости измерений сигнала, и при их тщательном контроле (3).

Предпочтительнее остановить свой выбор на теоретической модели. Однако, как правило, выбор метода построения КК существенно ограничен возможностями доступного ПО – присутствует либо logit-log модель, либо 4PL. Как показано в Приложениях 1 и 2, построение logit-log, является упрощением модели 4PL, и его, в принципе, может быть достаточно для расчета концентрации аналита в конкурентных анализах с удовлетворительной точностью. Однако следует отдавать себе отчет в том, что, если важна высокая точность определения аналита, 4PL дает более точные результаты, чем logit-log (8). Если есть возможность выбора между моделями 4PL и 5PL, рекомендуется предпочесть последний вариант.

Разные участки калибровочной кривой характеризуются разной степенью неprecизионности, поэтому наилучшая аппроксимация зачастую получается при учете статистического веса каждой отдельной точки (4, 7). Если ПО позволяет, желательно применять взвешенный подбор. При построении графика по методу взвешенных наименьших квадратов максимальная значимость придается наиболее точно измеренным значениям сигнала. Значениям сигнала приписываются веса, которые обратно пропорциональны дисперсии между репликатами. Следовательно, точкам с наибольшей точностью, т.е. с наименьшей дисперсией приписывается наибольший вес. Как правило, в иммуноанализе величина дисперсии при различных концентрациях аналита не является постоянной. Для вычисления весов необходимо знать характер изменения погрешности, т.е. зависимость «сигнал-ошибка», во всем интервале КК. Однако в редких случаях, когда дисперсия примерно постоянна в интервале измеряемых концентраций, взвешенный подбор применять не обязательно, так как в такой ситуации его применение практически не изменит форму кривой (8).

Зависимость дисперсии от концентрации аналита может описываться линейным или квадратным уравнением. Адекватная математическая форма выражения выбирается путем построения графика зависимости наблюдаемой дисперсии от концентрации аналита и последующей проверки этой зависимости на соответствие предполагаемой модели. Для проведения таких статистических расчетов используется соответствующее ПО, в котором должен быть реализован метод оценки изменения погрешности.

При использовании метода взвешенного подбора, который учитывает изменения величины погрешности вдоль всего интервала концентраций, так же следует удостовериться, что выбранная математическая модель реализована корректно (см. Приложение 3).

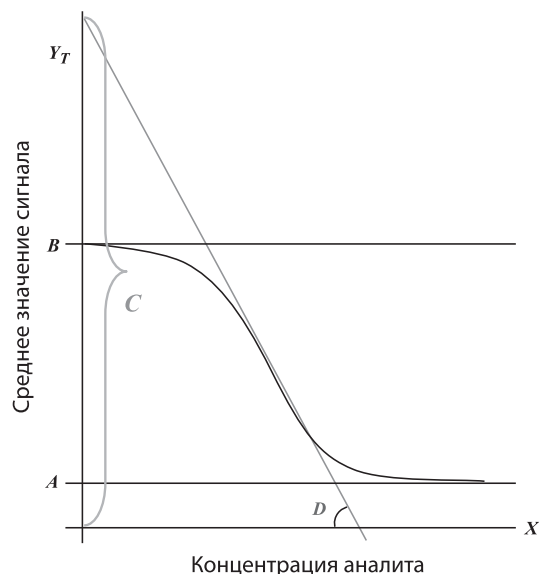


Рис. 5
Форма калибровочной зависимости для конкурентного иммуноанализа, полученная на основе теоретической модели – кривая сигмоидной формы с одной точкой перегиба и двумя асимптотами.
A, B, C, D – параметры 4PL (объяснения см. в Приложении 1)

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Логарифмические логистические модели 4PL и 5PL

Обозначим истинное среднее значение сигнала как Y_T , а концентрацию – как X . Математическое выражение для модели 4PL имеет вид:

$$Y_T = A + \frac{(B - A)}{(1 + Z)} \quad \text{где } Z = e^{C + D \times \ln(X)}$$

Значения параметров A, B, C и D требуется установить. Для тех разновидностей анализа, в которых среднее значение сигнала убывает с увеличением концентрации, $D > 0$. Для таких анализов при $X \rightarrow \infty$, $Z \rightarrow \infty$. Следовательно, $Y_T \rightarrow A$. Аналогичным образом, при $X \rightarrow 0$, $Z \rightarrow 0$, следовательно, $Y_T \rightarrow B$. Таким образом, значения A и B представляют собой асимптоты, которые показаны на Рисунке 5. На этом рисунке приведен модельный график для конкурентного анализа. Через его характеристики становится возможным интерпретировать параметры A и B. Параметр A представляет собой средний уровень сигнала для «бесконечной» дозы, который часто обозначается как «фоновый сигнал». Параметр B – это средний уровень сигнала для нулевой концентрации. C – отрезок, отсекаемый прямой на оси Y и D – угловой коэффициент прямой.

Логарифмическая логистическая модель с четырьмя параметрами (4PL). Во всех видах анализа для построения графика методом 4PL выполняется оценка четырех параметров (A, B, C и D). В алгоритме построения, кроме интенсивности сигнала при нулевой концентрации и «фоновом сигнале», учитываются также значения сигнала для всех остальных калибровочных проб.

4PL и подобные нелинейные модели (5, 10, 11) применяются давно. Обычно они очень хорошо работают для самых разнообразных иммуноанализов, хотя проблемы полностью все еще не исключены. Приведем пример. Один из авторов

(7) на собственном опыте наблюдал, как при использовании программного продукта, специально разработанного для построения графиков методом 4PL, систематически отмечалось несоответствие между данными и графиком. На первый взгляд, это говорило о неадекватности выбранной модели. Впоследствии удалось обнаружить, что неэффективным, а следовательно, непригодным, был один из использованных в программе алгоритмов. Построение графиков по нелинейной модели требует мощных вычислительных алгоритмов, которые по своей сути являются итеративными (т.е. повторно применяемыми). Если исходный алгоритм неэффективен, то после того, как он будет последовательно применен некоторое заданное число раз (как это делается в обычной практике), можно не достичь схождения и поэтому полученные значения параметров приведут к несоответствию модели исходным данным. В большинстве итеративных алгоритмов для начала итеративного процесса требуется задать некоторые значения, которые не должны сильно отличаться от оптимальных для данного параметра. В противном случае, поиск численных решений может привести к ложному результату. Этот пример наглядно иллюстрирует высказанное в начале статьи положение о том, что даже правильно подобранные теоретические модели, реализованные в ПО, могут давать КК неадекватные полученным данным. Поэтому, соответствие КК исходным данным следует проверять даже в том случае, когда она построена компьютером с применением теоретической модели. В приведенном примере одним из путей решения проблемы может быть использование другой программы построения графиков, при условии, что она основана на той же математической модели (7).

Логарифмическая логистическая модель с пятью параметрами (5PL) представляет собой развитие модели 4PL. Вводится дополнительный параметр E, за счет которого становится возможной некоторая асимметрия калибровочного графика. Однако, как в любых моделях, чем больше параметров участвует в построении, тем больше данных требуется для того, чтобы конечные построения оставались одинаково достоверными.

В некоторых практических приложениях модели 5PL лучше всего использовать накопленные данные по большому количеству калибровочных проб, чтобы получить достоверную оценку величины E, а затем считать эту величину постоянной, и не определять ее при каждом анализе, т.е. свести 5PL к 4PL.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Преобразование logit-log

Математическое выражение для зависимости 4PL можно привести к виду:

$$r = \frac{(Y_T - A)}{(B - A)} = \frac{1}{(1 + Z)}$$

В этом выражении представлено как доля сигнала, значение которой находится в пределе от 0 до 1. Это уравнение возможно преобразовать:

$$\ln \frac{(1-r)}{(r)} = \ln(Z) = C + D \times \ln(X)$$

Функция в левой части уравнения, очевидно, представляет собой $\logit(r)$, таким образом, уравнение приобретает окончательный вид:

$$\text{Logit}(r) = C + D \times \ln(X)$$

Это и есть так называемая модель $\logit\text{-log}$. Очевидно, что она является частным случаем модели 4PL. Различие заключается в способе построения кривой. В модели 4PL параметры A и B определяются по установленному алгоритму, а в модели $\logit\text{-log}$ их значения считаются известными. В случае конкурентного анализа параметр A считается равным фоновому сигналу, а параметр B – среднему значению сигнала для калибровочной пробы с нулевой концентрацией. При этом модель сводится к линейной функции с переменными параметрами C и D(6).

Таким образом, для конкурентных анализов 4PL и $\logit\text{-log}$ методы построения КК эквивалентны при условии, что расчетные значения параметров A и B в модели 4PL будут совпадать с полученными экспериментальным путем значениями фонового сигнала и сигнала в калибровочной пробе с нулевой концентрацией, соответственно. Аналогичным образом можно добиться эквивалентности этих моделей и в сэндвич-анализах, но в этом случае через A обозначается величина фонового сигнала, т.е. сигнала в калибровочной пробе с нулевой концентрацией, а через B – значение верхнего асимптотического предела, которое весьма трудно определить экспериментальным путем.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Проверка выбранной для построения КК модели на корректность реализации алгоритма расчетов

Большинство специализированных программ позволяют выполнить такую проверку. Рассматривая калибровочные пробы как неизвестные образцы, они производят обратное вычисление концентрации аналита в каждой калибровочной пробе на основании значения сигнала и соответствующих параметров графика. Следует помнить, что этот способ проверки адекватности алгоритма расчета данных ИФА бессмысленно применять в случае использования для построения КК кусочно-линейной аппроксимации и интерполяционных сплайнов, так как неизменным условием построения КК этими методами служит ее прохождение через все точки; следовательно рассчитанные концентрации калибраторов всегда будут равны заданным производителем.

Если использовать пять калибровочных проб, измеренных по три раза каждая, то полученные в результате интерполяции значения концентраций будут сгруппированы в пять «кластеров» по три значения. Для каждого кластера можно вычислить среднее значение концентрации. Сравнивая полученные таким образом средние значения концентрации калибровочных проб с их номиналами, можно оценить адекватность выбранной модели исходным данным (7, 12). Чем ближе вычисленные по КК значения концентрации калибровочных проб к номиналам (истинным значениям) и чем меньше вариабельность для каждой точки (выражается ошибкой среднего, коэффициентом вариации (КВ) или дисперсией), тем точнее модель описывает полученные данные. Накопив и проанализировав достаточное количество таких данных, можно получить информацию об адекватности построения и достоверно оценить величину систематической погрешности, вносимой в процессе построения графика.

Рекомендации

1. На каждом планшете КК обязательно должна быть поставлена в дубликатах. На практике всегда наблюдается тот или иной «разброс» ($KV \neq 0$) между отдельными измерениями сигнала в одной и той же пробе (репликатами). Средние значения репликатов менее подвержены влиянию случайных факторов и, как правило, лучше отражают истинное значение (при условии, что среди результатов отсутствуют явные выбросы). При построении калибровочных кривых нужно убедиться, что на калибровочный график нанесены как значения отдельных репликатов, так и средние их значения. После этого следует исключить из обработки очевидные выбросы и заново построить КК. Лишь после этого можно приступить к геометрическому (как в ручном, так и в компьютеризированном варианте) определению концентрации аналита в пробах. Для получения достоверных результатов анализ проб пациентов также необходимо проводить в дубликатах. По разбросу вычисленных для репликатов концентраций можно судить о качестве эксперимента. Чем больше этот разброс, как правило, оцениваемый коэффициентом вариации, тем хуже качество эксперимента. Максимальное допустимое значение разброса между репликатами указано производителем в инструкции к набору.

2. При построении калибровочных кривых следует помнить, что существует зависимость погрешности измерения концентрации от интенсивности сигнала, обусловленная как свойствами самого анализа, так и техническими характеристиками используемого для регистрации сигнала оборудования. В частности, за счет неточного считывания слишком низкой или слишком высокой оптической плотности вариабельность результатов на концах динамического диапазона анализа всегда выше, чем в его центре. Следовательно, при клинической интерпретации

результатов измерения концентрации аналита вблизи границ измеряемого диапазона нужно соблюдать известную осторожность. В случае очень высокой концентрации аналита рекомендуется выполнить разведение пробы и повторить анализ. В случае низкой концентрации, вблизи предела чувствительности метода следует помнить, что объективная ценность таких данных невелика.

3. При каждой постановке анализа КК следует ставить заново, поскольку условия проведения анализа могут варьировать от постановки к постановке, и использование КК, полученной в условиях, отличных от текущих даст некорректные результаты.

4. Использование одной КК на несколько постановок допускается только в некоторых автоматических анализаторах, где условия проведения анализа стабильны и при каждой постановке все же используют 2-3 калибровочных пробы для верификации полученной ранее КК.

ЛИТЕРАТУРА

- Сахаров В.Л. Методы и средства анализа медико-биологической информации: Учебно-методическое пособие. Таганрог. Изд-во ТРТУ. 2001. с 9-15
- Теория и практика иммуноферментного анализа Москва. Высшая школа. 1991. с. 256-260
- Шикин Е.В., Плис А.И. Кривые и поверхности на экране компьютера. Руководство по сплайнам для пользователей. - М.: ДИАЛОГ-МИФИ, 1996. 240 с.
- Чард Т. Радиоиммунологические методы. Москва, Мир. 1981. с. 146-149
- Faden, V. B., and Rodbard, D., Radioimmunoassay Data Processing, 3rd ed., National Technical Information Service, Report PB246224 (Printed Listings), Springfield, Va. 22151, 1975.
- Fernandez A.A., Stevenson G.W., Abraham G.E., Chiamori N.Y. Interrelations of the Various Mathematical Approaches to Radioimmunoassay. Clin. Chem. 1983, 29 (2), 284-289
- Nix B., Wild D. Part 9. Data processing In book: Immunoassays. Practical approach. Gosling J.P. (Ed.), Oxford University press. 2000. p. 239-260
- Plikaytis B. D., Turner S. H., Gheesling L. L., Carlone G. M. Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay J. Clin. Microbiol., Vol. 29, No. 7 July 1991, p. 1439-1446
- Rodbard, D., and Lewald, J. E., Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 64, Suppl. 147, 79 (1970)
- Rodbard, D., and Hutt, D. M., Statistical analysis of radioimmunoassay and immunoradiometric (labeled antibody) assays: A generalized weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting. In Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Vol.1. Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1974, pp 165-192.
- Rodbard D, Feldman Y. Kinetics of two-site immunoradiometric ('sandwich') assays-I. Mathematical models for simulation, optimization, and curve fitting. Immunochemistry. 1978 Feb;15(2):71-76
- Sasaki D and Mitchell R A 2002 How to obtain reproducible quantitative ELISA results (Oxford Biomedical Research, Inc. <http://www.oxfordbiomed.com/artqelis.html>)