

УДК 612.017.1

А.В. БОЙКО\*, О.С. КУЗНЕЦОВ, М.Н. КИРЕЕВ, П.С. ЕРОХИН, Е.А. МИХЕЕВА, Н.А. ОСИНА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, 410005

e-mail: rusrap1@microbe.ru

## Количественная оценка результатов дот-иммуноанализа

Показана возможность количественной оценки результатов дот-иммуноанализа, не лимитированная наличием специализированного оборудования. Разработанная программа для количественной оценки оцифрованного изображения нитроцеллюлозных мембран после дот-иммуноанализа в сочетании с выбором аппроксимирующей функции для зависимости величины полученного сигнала от концентрации анализируемого вещества позволяет достоверно определять эти концентрации. При этом различия между экспериментальными и расчетными значениями концентрации статистически незначимы.

*Ключевые слова:* дот-иммуноанализ.

Одним из направлений в улучшении лабораторной диагностики инфекционных болезней ВОЗ считает развитие и использование иммунохроматографического метода [1]. Основными преимуществами методов, основанных на принципах иммунохроматографии, являются операционная простота, позволяющая получать результат анализа без специальных оборудования и навыков, быстрого диагностического исследования, возможность сохранения результатов анализа путем фоторегистрации (сканирование, фото- и видеорегистрация), высокая чувствительность и достоверность. Данные свойства определяют и место приложения этих методов, к которым относятся прежде всего средние и малые лаборатории, а также возможность их использования в условиях urgentных ситуаций.

В нашей стране применение иммунохроматографических методов регламентировано для диагностики как инфекционных, так и неинфекционных болезней, например, для выявления антигена бактерий *Legionella pneumophila* [2], для диагностики ВИЧ [3] и инфаркта миокарда в лечебных учреждениях и при неотложной медицинской практике [4], а также для определения содержания наркотических веществ [5].

В большинстве случаев иммунохроматографические тесты позволяют получать результат анализа только в альтернативной форме (обнаружено — не обнаружено). Вместе с тем, в ряде публикаций отмечалась принципиальная возможность инструментального учета и количественной оценки иммунохроматографических тестов, в том числе с применением экспериментальных ви-

---

Бойко Андрей Витальевич, Кузнецов Олег Святославович, Киреев Михаил Николаевич, Ерохин Павел Сергеевич, Михеева Елена Александровна, Осина Наталия Александровна.

*Список сокращений:* БСА — бычий сывороточный альбумин; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; н.е. — нормализованная единица; НИОС — нормализованная интенсивность отраженного света; ПЭГ — полиэтиленгликоль.

\* Автор для переписки.

деоцифровых анализаторов иммунохроматограмм [6—8].

Целью настоящей работы явилась разработка метода количественной оценки результатов дот-иммуноанализа, не лимитированного наличием специального оборудования, и алгоритма его реализации.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы.** В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), твин-20 (Amresco, США), белок А золотистого стафилококка (Sigma, США), нитроцеллюлозную мембрану Millipore (Cat. no. HAWG 000 10Lot N H3870162 A) с размером пор 0,45 мкм., ПЭГ-20 М (Serva, Германия), воду деионизованную, 1%-ный раствор золотохлористоводородной кислоты ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Fluka AG, CH-9470 Buchs) для приготовления коллоидного раствора золота и 1%-ный раствор цитрата натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Analar, Великобритания).

**Иммуноглобулины.** Для моделирования дот-иммуноанализа использован антирабический иммуноглобулин производства ФКУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб»». Препарат (серия 140) содержал 100 мг/мл иммуноглобулинов. Готовили двухкратные разведения препарата от 1:10 до 1:5242880, которые и были использованы при моделировании дот-иммуноанализа.

**Конъюгат.** Раствор коллоидного золота со средним диаметром частиц 15—17 нм готовили по методу Г. Френса. Для этого в колбу Эрленмейера с обратным холодильником помещали 241,4 мл деионизованной воды и доводили ее до кипения. Затем последовательно добавляли 2,5 мл 1%-ной золотохлористоводородной кислоты и 7,8 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке кипятили в течение 20 мин. Полученный раствор коллоидного золота хранили до приготовления конъюгатов во флаконах из темного стекла.

При изготовлении конъюгата в качестве антигена использовали белок А золотистого стафилококка. Для связывания частиц маркера с антигеном в раствор коллоидного золота при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке добавляли необходимое количество антигена в соответ-

ствии с выявленным «золотым числом»\*. С целью блокировки свободных сайтов связывания поверхности наночастиц золота и вторичной стабилизации конъюгата к нему добавляли 0,5 %-ный раствор высокомолекулярного полимера ПЭГ-20 М до конечной концентрации 0,02%. Затем полученный диагностикум выдерживали в холодильнике не менее 1 ч до использования.

**Дот-иммуноанализ.** На нитроцеллюлозную мембрану наносили по 2 мкл иммуноглобулинов из каждого разведения. Мембрану высушивали на воздухе в течение 15 мин при комнатной температуре, затем блокировали 2%-ным раствором БСА в течение 30 мин. После этого мембрану промывали 0,9%-ным раствором хлористого натрия, содержащим 0,05 % твина-20, и трижды деионизованной водой. Отмытые мембраны помещали в конъюгат коллоидного золота с белком А и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации мембраны промывали дистиллированной водой, высушивали и получали оцифрованное изображение путем сканирования.

**Компьютерные программы.** Для количественной оценки оцифрованного изображения нитроцеллюлозных мембран использовали «Универсальную компьютерную программу для количественного учета биохимических реакций», разработанную М. Н. Киреевым с соавт. (Свидетельство об официальной регистрации программ для ЭВМ № 2006612852. Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 10 августа 2006 г.). Данная программа предназначена для обработки оцифрованных любым известным способом изображений и сохраненных в форматах: jpg, jpeg и bmp. Программа позволяет:

— определять интенсивность отраженного света от любой области изображения в красной, зеленой и синей областях видимого света, а также в градациях области серого света, и получать количественный результат в нормализованных значениях;

— изменять площадь области определения нормализованной интенсивности отраженного света (НИОС) за счет изменения диаметра визира;

— фиксировать область определения НИОС в любом месте изображения.

\* Золотое число — величина, характеризующая защитное действие эмульсионного коллоида. Этим термином обозначают его количество, которое является пороговым, но еще недостаточным, чтобы предотвратить перемену окраски интенсивно красного гидрозоля золота на синюю (зависящей от степени дисперсности частиц коллоида) при добавлении к нему в определенных условиях 10%-ного раствора NaCl.

Программа имеет простой и интуитивно понятный интерфейс.

Благодаря перечисленным свойствам разработанная программа обладает практически неограниченными возможностями использования и позволяет легко менять режим определения НИОС для приспособления к конкретным требованиям экспериментатора.

Программа Microsoft Office Excel 2007 содержит все инструменты, необходимые для анализа полученных данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выбор области спектра для измерения НИОС

Нитроцеллюлозную мембрану после дот-иммуноанализа фотографировали и с помощью «Универсальной компьютерной программы для количественного учета биохимических реакций» измеряли НИОС каждой реакционной зоны в красной, зеленой, синей областях видимого спектра и в градациях серого. Каждую реакционную зону оценивали не менее 9 раз. По полученным средним значениям строили графики зависимости НИОС от концентрации иммуноглобулинов в пробе (рис. 1).

Как видно из рис. 1, графики зависимости НИОС от концентрации иммуноглобулинов делятся на две области: немонотонная (при концентрации иммуноглобулинов в пробе от 100 мг/мл (точка 1) до 0,7813 мг/мл (точка 8) и монотонная (концентрация иммуноглобулинов в пробе от 0,3906 мг/мл (точка 9) до 0,0061 мг/мл (точка 15)).

Немонотонная область графика имеет форму, приближающуюся к Гауссовому распределению, и мало пригодна для определения концентрации иммуноглобулинов по НИОС, поскольку каждому значению НИОС соответствуют два значения

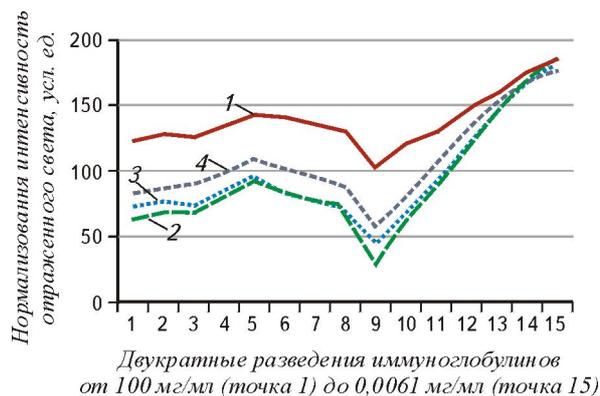


Рис. 1. Зависимость нормализованной интенсивности отраженного света от концентрации иммуноглобулинов в следующих областях спектра: 1 — красная; 2 — зеленая; 3 — синяя; 4 — градации серого

концентрации иммуноглобулинов этой области графика и одно значение из монотонной области.

Монотонная область графика может быть описана линейной возрастающей функцией. В этой части можно выбрать такие значения функции, при которых одному значению НИОС соответствует одно значение концентрации иммуноглобулинов, что может быть использовано для достижения поставленной цели.

Таким образом, весь диапазон зависимости НИОС от концентрации иммуноглобулинов не может быть использован для нахождения аппроксимирующей функции, так как при всех в целом исследованных концентрациях иммуноглобулинов НИОС достаточно слабо коррелирует с их количеством в крови (коэффициент корреляции  $r = -0,7131$ ). Корреляция НИОС с высоким содержанием иммуноглобулинов (соответствует немонотонной области графика) еще ниже,  $r = -0,3125$ . И только в случае, когда концентрация иммуноглобулинов в пробе достаточно низка (от 0,3906 до 0,0061 мг/мл) коэффициент корреляции достаточно высок ( $r = -0,9051$ ),

Таблица 1

### Корреляция между НИОС и концентрацией иммуноглобулинов в пробе в зеленой области видимого спектра

Область графика	Концентрация иммуноглобулинов в пробе, мг/мл	Корреляция НИОС с концентрацией иммуноглобулинов в зеленой области спектра
Немонотонная область	100—0,7813	- 0,3125
Весь диапазон значений НИОС	100—0,0061	- 0,7131
Монотонная область	0,3906—0,0061	- 0,9051

**Выбор области спектра для измерения НИОС**

Область спектра измерений	tg угла наклона монотонной области графика	Угол наклона монотонной области графика, град.	Диапазон значений НИОС, усл. ед.
Красный	1,021	≈45°	82
Зеленый	1,968	≈63°	158
Синий	1,365	≈54°	109,6
Градации серого	1,158	≈49°	93

что позволяет говорить о возможности использования в данном случае предлагаемого подхода (табл. 1).

Для выбора спектра, в котором следует проводить измерения НИОС, были рассчитаны углы наклонов кривой в монотонной области полученных графиков (табл. 2), так как при определении концентрации графическим методом по калибровочной кривой удобнее использовать функцию, имеющую угол наклона в 45°, что позволяет минимизировать ошибочные результаты. В нашем случае такой угол был характерен для красной области спектра.

Однако графический подход к определению концентрации достаточно громоздок, особенно в случае, когда требуется построение калибровочной кривой для каждой серии экспериментов. Рациональнее использовать расчетный метод, который при наличии вычислительной техники значительно сокращает время, минимизирует трудозатраты, повышает точность, а также является более простым по сравнению с графическим. При расчетном способе используется тот спектр, который позволяет получать значения НИОС в наибольшем диапазоне значений, что сокращает вероят-

ность ошибочных результатов, возникающих из-за погрешностей измерения. В нашем случае — это зеленый спектр, поскольку диапазон значений НИОС наибольший — 158 усл. ед. (см. табл. 2).

**Выбор аппроксимирующей функции монотонной части графика**

Наилучшая аппроксимация достигается использованием экспоненциальной функции вида

$$Y = b \cdot e^{ax},$$

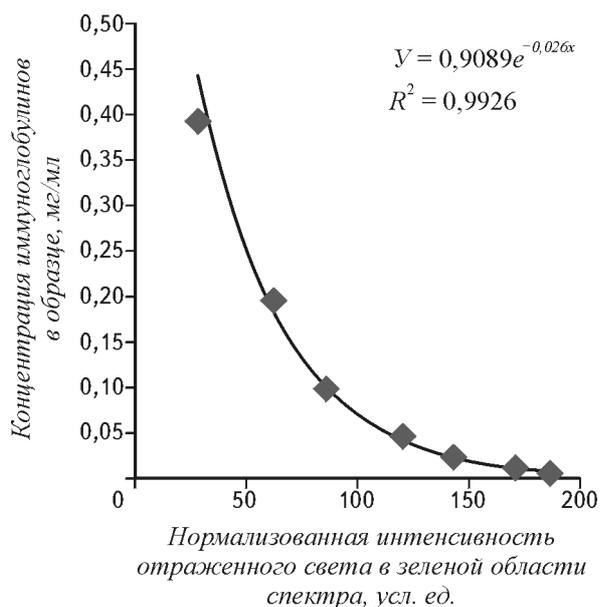
где  $a$  и  $b$  — константы,  $e$  — основание натурального логарифма,  $x$  — нормализованная интенсивность отраженного света.

Основанием для выбора аппроксимирующей функции явилась величина достоверности аппроксимации  $R^2$ . Как видно из табл. 3 и рис. 2, наиболее достоверно выявленная зависимость аппроксимируется экспоненциальной функцией, при которой  $R^2 = 0,9926$ , а функция описывается формулой  $Y = 0,9089 \cdot e^{-0,026x}$ .

Таблица 3

**Выбор аппроксимирующей функции зависимости НИОС (в зеленой области спектра) от концентрации иммуноглобулинов**

Вид функции	Величина достоверности аппроксимации ( $R^2$ )	Уравнение функции
Экспоненциальная	0,9926	$Y = 0,9089 \cdot e^{-0,026x}$
Линейная	0,8191	$Y = -0,0022 \cdot x + 0,359$
Логарифмическая	0,9687	$Y = -0,206 \cdot \ln(x) + 1,0511$
Степенная	0,8941	$Y = 769,33 \cdot x^{-2,113}$



**Рис. 2.** Аппроксимация зависимости НИОС от концентрации иммуноглобулинов экспоненциальной функцией: ◆ — экспериментальные значения; — аппроксимирующая экспоненциальная функция

С целью подтверждения пригодности найденной функции для определения концентрации иммуноглобулинов по приведенной формуле были рассчитаны теоретические концентрации иммуноглобулинов, которые были сравнены с эмпирическими (табл. 4). Статистически значимые различия между эмпирическими и теоретически полученными значениями концентрации иммуно-

глобулинов не выявлены, что свидетельствует об эффективности предложенной аппроксимации зависимости НИОС от концентрации иммуноглобулинов и возможности количественной оценки дот-иммуноанализа с использованием настоящего подхода.

Следует однако отметить, что нижняя часть монотонной области функции (см. рис. 1) непригодна для определения концентрации иммуноглобулинов, поскольку одно и то же значение функции соответствует разным концентрациям белков в монотонной и немонотонной областях графика. В нашем случае непригодная область ограничена значениями НИОС от 63 ед до 92,7 ед, внутри которой одному значению НИОС могут соответствовать от 1 до 3 различных значений концентрации иммуноглобулинов (см. рис. 1). В описываемом случае пригодной для целей определения концентрации иммуноглобулинов является область функции при значениях НИОС больше 92,7 ед., в пределах которой концентрация иммуноглобулинов менее 0,0816 мг/мл.

Таким образом, показана возможность количественной оценки дот-иммуноанализа с помощью «Универсальной компьютерной программы для количественного учета биохимических реакций». Описанный метод количественной оценки дот-иммуноанализа не зависит от наличия специализированных приборов-регистраторов. Выявленные количественные ограничения по определению концентрации иммуноглобулинов согласуются с зако-

Таблица 4

**Сравнение эмпирических и теоретически полученных (вычисленных по формуле) концентраций иммуноглобулинов**

Эмпирическая концентрация иммуноглобулинов, мг/мл	НИОС, усл. ед.	Теоретические концентрации иммуноглобулинов, мг/мл	Достоверность различий
0,3906	28	0,4388	$t_{\Phi}^* = 0,0427,$ $p \gg 0,05$
0,1953	62	0,1813	
0,0977	85,6667	0,0979	
0,0488	119,6667	0,0404	
0,0244	143	0,0221	
0,0122	170,3333	0,0108	
0,0061	186	0,0072	

\*Фактическое значение t-критерия Стьюдента.

ном Бугера—Ламберта—Бера [9], на основе которого разработаны фотометрические методы определения концентрации различных веществ, и относятся к препаратам, содержащим искусственно сконцентрированные иммуноглобулины.

Получено 19.12.14

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Совещание Стратегической консультативной группы экспертов по иммунизации, ноябрь 2011 года — выводы и рекомендации // Еженедельный эпидемиологический бюллетень. — 2012. — В. 87. — № 1. — 16 с.
2. Выявление антигена бактерий *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом: Методические рекомендации. / Утв. Руководителем федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г.Онищенко 9 декабря 2008 г. № 01/14633-8-34. — М.: Отд. издат. обеспечения Федер. центра гигиены и эпидемиологии, 2010. — 10 с.
3. Об использовании иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови человека // Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 292 от 30 июля 2001 г. — М.: Медицина, 2001. — 8 с.
4. Шибанов А.Н., Гервазиев Ю.В. Экспресс-диагностика инфаркта миокарда. <http://unimeda.ru/articles/6826/12186/>
5. Симонов Е.А., Сорокин В.И., Ковалев А.В. Средства экспресс обнаружения наркотиков / Техника для спецслужб. Бюро Научно-Технической Информации // [www.bnti.ru/showar.asp?aid=621&lvl=03.05.03](http://www.bnti.ru/showar.asp?aid=621&lvl=03.05.03)
6. Полтавченко А.Г. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа / А. Г. Полтавченко, А. В. Ерш, С. А. Пьянков, А. М. Никонов, Г. Н. Волков, Н. А. Кривенчук // Биотехнология. — 2013. — № 4. — С.74—82.
7. Третьяков С.И. Разработка количественных иммунохроматографических тестов для определения маркеров соматических заболеваний / С. И. Третьяков, Л. А. Башарова, С. П. Ярков, А. А. Титов, Е. Н. Храмов // Вестник РАМН. — 2013. — № 9. — С.52—57.
8. Старовойтова Т. А. Иммунохроматографический анализ простатического специфического антигена с видеоцифровой регистрацией / Т. А. Старовойтова, В. В. Зайко, С. Г. Волощук, Н. А. Стериополо, Л. П. Мартынкина, М. И. Савина, Н. А. Зайцева, Р. Т. Тогузов, Ю. Ю. Венгеров // Клин. лабораторн. диагностика. — 2005. — № 9. — С.24—25
9. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа — Изд-е пятое, переработанное. — Ленинград: Химия, Ленинградское отд., 1986. — 432 с.

A.V. BOIKO\*, O.S. KUZNETSOV, M.N. KIREEV,  
P.S. EROKHIN, E.A. MIKHEEVA, and N.A. OSINA

The Russian Research Antiplague Institute *Microbe*, 410005,  
Saratov Russia

e-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

#### A Quantitative Assessment of Dot-Immunoanalysis

A quantitative assessment of the results of dot-immunotest without the application of special equipment has been performed. A specially designed software for the quantitative analysis of digital images of nitrocellulosic membranes after dot-immunoanalysis in combination with a function approximating the dependency of the produced signal on analyte concentration permits to reliably assess this concentration. The differences between the obtained experimental and rated concentration values were statistically insignificant.

*Key words:* dot-immunotest.

---

\* Author for correspondence.