

Методы оценки рисков ложного срабатывания иммунохроматографических тест - систем.

С.С. Голубев, М.В. Зеленкова, Я.А. Короленко, Ю.А. Кудеяров, Д.А. Филимонов.

Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы.

***Аннотация.** Отмечается, что из-за несовершенства тест-систем иммунохроматографического анализа всегда имеется вероятность принятия неверного решения по его результатам. Количественной мерой принятия такого решения является его вероятность. В статье рассмотрены методы, основанные на вычислении условных вероятностей, с помощью которых оцениваются вероятности ошибок 1го и 2го рода при иммунохроматографическом анализе. Приводятся три метода оценки таких ошибок: аналитический, численный и метод, основанный на рассмотрении метода КК как метода косвенных измерений. В предположении, что имеют дело только со случайной составляющей погрешности измерений, получен график зависимости вероятности ложного срабатывания от концентрации анализируемого вещества.*

***Ключевые слова:** риски ложного срабатывания, ложноположительный результат, ложноотрицательный результат, ошибки 1 и 2 рода, иммунохроматография, экспресс - тесты.*

Methods of immunoassay strip-test false result risks estimate

S.S. Golubev, M.V. Zelenkova, Ya.A. Korolenko, Yu.A. Kudeyarov, D.A. Filimonov, All-Russian scientific research institute of metrological service (VNIIMS).

Contact information: 119361, Ozernaya Str.46, e-mail: golubev@vniims.ru, zelenkova@vniims.ru, kudeyarov@vniims.ru.

Abstract. *It was noted, that because of imperfection of immunoassay systems it is always possible to take incorrect decision. The quantitative measure of taking of this wrong decision is the probability of this mistake. The methods, based on calculation of conditional probability, which can lead to calculate the probabilities of mistakes of the first and the second type for immunoassay analysis, described in this paper. Three methods to calculate these mistakes were developed and shown in this paper: the analytical one, the numerical one and the method, based on calibration curves as indirect method. In assumption that only random errors of measurements take place, the dependency between probability of mistake and concentration of antigen was determined.*

Key words: *false result risks, false-positive result, false-negative result, 1-st u 2-nd type errors, immunochromatography, strip-test*

Иммунохроматографические экспресс - тесты на сегодняшний день являются одним из успешных примеров применения нанотехнологической продукции. Механизм их действия основан на взаимодействии между объектами (макромолекулами, антителами и т.п.) с характерным размером частиц менее 100 нм. В последние годы эти тест-системы стали одним из основных инструментов в различных областях медицинской диагностики, контроля качества продукции и оценки загрязнения окружающей среды. Причиной такой популярности является то, что экспресс - тесты являются доступным, быстрым и не требующим высокой квалификации оператора методом детектирования и диагностики. Зачастую исследуемый образец может быть нанесен на тест - полоску без длительной предварительной пробоподготовки. При этом результат тестирования может быть оценен визуально без использования дополнительного оборудования.

Тем не менее, данный метод не лишен недостатков. Эти недостатки до последнего времени были связаны с невозможностью автоматизиро-

ванного получения документации, с субъективной интерпретацией результатов тестирования и с отсутствием количественных оценок. В последнее время ситуация несколько улучшилась благодаря появлению основанных на новых технологиях тест-систем и автоматизированных приборов регистрации выходных сигналов. Очевидно, что широкому внедрению в массовое производство и применению рассматриваемых систем должно предшествовать исследование возможностей использования иммунохроматографического подхода для достижения не только качественных, но и количественных результатов анализа. Некоторые результаты такого рода исследований приведены, например, в работах [1] и [2], а также в методиках измерений [3] и [4].

Следует отметить, что вне зависимости от типа теста (качественный или количественный), основным его назначением является определение наличия или отсутствия вещества в пробе. Из-за несовершенства тест-систем (дефекты технологии изготовления тестовых полосок, погрешность средства измерений (ридера), используемого для измерения интенсивности свечения маркеров в исследуемом веществе, погрешность разведения проб, служащих для построения калибровочных кривых (КК) (градуировочных характеристик), и погрешность определения концентрации с помощью КК) всегда имеется некая вероятность принятия неверного решения по результатам анализа.

Таким образом, использование иммунохроматографических тест-систем для определения наличия и измерения концентрации веществ в пробах всегда сопровождается риском возможного ложного срабатывания таких тест-систем. Количественной мерой риска ложного срабатывания является вероятность такого срабатывания. В предлагаемой статье рассмотрены методы, основанные на вычислении соответствующих вероятностей, с помощью которых проводится оценка рисков ложного срабатывания иммунохроматографических тест-систем.

Таким образом, под риском ложного срабатывания понимается вероятность, с которой результат определения концентрации антигена в пробе может быть как ложноположительным, так и ложноотрицательным.

Ложноположительный результат (ошибка 1го рода) это результат, указывающий на присутствие вещества в пробе, в то время как его реальная концентрация меньше критического уровня. Ложноотрицательный результат (ошибка 2го рода) – результат, указывающий на отсутствие вещества в пробе, в то время как его концентрация превышает критический уровень.

В свою очередь, под критическим уровнем понимается максимально допустимая концентрация вещества в пробе. Считается, что при концентрации антигена в веществе меньше критического антиген реально отсутствует, а при концентрации выше критической – присутствует.

Перечень ситуаций, которые можно трактовать как ошибки первого и второго рода при иммунном анализе, для наглядности приведены в таблице 1.

Таблица 1. Возможные ситуации и характер ошибок первого и второго рода

Истинная ситуация	Результат контроля	Характер ошибки
Определяемое вещество в пробе <u>отсутствует</u>	Тестирование дает <u>отрицательный</u> результат	Ошибка <u>отсутствует</u>
Определяемое вещество в пробе <u>отсутствует</u>	Тестирование дает <u>положительный</u> результат	<u>Ошибка 1го рода</u> (ложноположительный результат)
Определяемое вещество в пробе <u>присутствует</u>	Тестирование дает <u>отрицательный</u> результат	<u>Ошибка 2го рода</u> (ложноотрицательный результат)
Определяемое вещество в пробе <u>присутствует</u>	Тестирование дает <u>положительный</u> результат	Ошибка <u>отсутствует</u>

Значение вероятности рисков ложного срабатывания во многом определяется параметрами КК и зависит от многих факторов.

Подходы к решению рассматриваемой задачи и некоторые полученные результаты ее решения приведены в итоговом отчете [5] и в раз-

работанной нами методике измерений [6], структура и содержание которой соответствуют требованиям ГОСТ Р 8.563-2009 [7].

В частности, в отчете [5] приводится анализ факторов, влияющих на риски ложного срабатывания иммунохроматографических тест - систем, таких как специфичность реагентов, входящих в комплектацию иммунохроматографических тест-систем, состав тестируемых биопроб, условия хранения и окружающей среды. Поэтому на этих аспектах обсуждаемой проблемы в предлагаемой статье мы останавливаться не будем.

Методика [6] основана на результатах экспериментальных измерений светимости тест - полосок при известных концентрациях анализируемого вещества, необходимых для определения КК конкретных типов тест - полосок, на методиках построения КК [3, 4] и других нормативных документах, а также на методах математической статистики, позволяющих производить оценку рисков ложного срабатывания. При этом следует отметить, что при разработке методов оценки рисков ложного срабатывания в распоряжении разработчиков полностью отсутствовала какая-либо предварительная статистика этих рисков, а также нормативные требования к допустимому уровню рисков таких срабатываний.

Исходя из КК, при построении которых измеряемой величиной является коэффициент светового отражения (КСО) аналитической зоны тестовой полоски и, в конечном итоге, светимость этой полоски, нельзя гарантировать точные результаты анализа проб с неизвестными концентрациями. Всегда имеют место риски совершения ошибок 1го или 2го рода. И если для ситуаций, связанных с возможностями совершения ошибок 2го рода, иногда имеется априорная информация, способствующая исключению таких ошибок (поведенческие и медицинские факторы), то в случае возможного проявления ошибок 1го рода такая априорная информации отсутствует.

Вероятность совершения ошибок 1го и 2го рода повышается по мере приближения значения светимости к критическому значению, под которым понимается светимость, отвечающая критической концентрации. Более того, можно показать, что при критическом значении концентрации вероятности совершения ошибок 1го и 2го рода сравниваются и достигают максимального уровня равного 0,5.

В отличие от качественных, количественные тест-системы позволяют оценить близость результата оценки концентрации к критическому значению, поэтому в данной статье и в методике измерений [6] основное внимание уделено количественным тест-системам.

При оценке рисков (рис 2) ложного срабатывания и выделения областей, в которых возможно ложное срабатывание, необходимо обратить внимание на то, что на самом деле значения светимости, служащие для построения КК методом наименьших квадратов (МНК), измеряются с погрешностью, значения которой для конкурентного метода тестирования в области малых концентраций могут быть значительными (порядка среднеквадратического отклонения (СКО) и более).

При оценке рисков ложного срабатывания в каждой точке k ($k = 1, 2, \dots, m$, где m - число стандартных разведений анализируемого вещества) измеренного значения светимости \bar{I}_k (среднего значения светимости по результатам многократных измерений) откладываются по оси светимости в обе стороны от среднего значения отрезки длиной ΔI_k (погрешность измерения светимости при k -м стандартном разведении). В результате получаем 3 набора точек: средние значения светимости \bar{I}_k , верхние оценки светимости $\bar{I}_k + \Delta I_k$ и нижние оценки $\bar{I}_k - \Delta I_k$. Как известно [3], по средним значениям светимости методом наименьших квадратов строится КК. Что же касается наборов точек, соответствующих верхним и нижним оценкам светимости, то для них также методом наименьших квадратов строятся аналогичные кривые. Особенность по-

строения этих кривых сводится к аппроксимации МНК полученных ранее значений погрешности известными зависимостями (см. формулы (1) и (2)), а затем к откладыванию значений ΔI_k в нужных точках вверх и вниз от КК. Таким образом, получаются три кривые, рассчитанные по трем указанным наборам точек: КК, рассчитанная по средним значениям светимости по МНК, верхняя и нижняя характеристики. Соответствующие графики представлены на рисунке 1, при этом КК построены в предположении, что они могут быть описаны следующими функциями: в случае прямой зависимости (сэндвич-анализ)

$$I(n) = A(1 - e^{-Bn}), \quad (1)$$

в случае обратной зависимости (конкурентный анализ)

$$I(n) = A \cdot e^{-Bn} + C, \quad (2)$$

где $I(n)$ – КК, описывающая зависимость сигнала от концентрации n , построенная по средним значениям светимости \bar{I}_k ,

A, B, C – численные коэффициенты, рассчитанные в соответствии с методикой измерений [3].

Из рисунка 1, представляющего обратную зависимость, видно, что разброс измеренных значений светимости при заданной концентрации n_k в пределах интервала $2\Delta I_k$, определяемого погрешностью измерений светимости, приводит к погрешности измерения концентрации по калибровочной кривой, равной интервалу $2\Delta n_k$.

Предположим теперь, что концентрация анализируемого вещества в пробе $n < n_{кр}$. Это означает, что измеренное с помощью КК значение концентрации n_k будет также находиться левее критической концентрации $n_{кр}$, и на этом основании будет принято решение об отсутствии вещества в пробе. Но поскольку концентрация измеряется с погрешностью, границы которой определяются интервалом $[n_k - \Delta n_k, n_k + \Delta n_k]$, при некоторых условиях может получиться так, что часть этого интервала

$[n_{кр}, n_k + \Delta n_k]$ может находиться правее критической концентрации, и измеренное значение концентрации с определенной вероятностью может оказаться в этой части интервала. И если на основании такого измерения принимается решение о присутствии вещества в пробе, в то время как оно реально отсутствует, то будет совершена ошибка 1го рода (см. табл. 1). Вероятность попадания измеренного значения концентрации в интервал $[n_{кр}, n_k + \Delta n_k]$ пропорциональна длине этого интервала, другими словами, и вероятность совершения ошибки 1го рода пропорциональна длине этого интервала (это утверждение справедливо, когда функция распределения плотности вероятности для концентрации является равномерной).

В противоположном случае, когда анализируемое вещество в пробе заведомо присутствует, т.е. $n > n_{кр}$, полученная по КК концентрация n_k должна находиться правее критической концентрации $n_{кр}$. Наличие погрешности измерения концентрации, как и в предыдущем случае, может привести к попаданию измеренного значения в интервал $[n_k - \Delta n_k, n_{кр}]$, на основании чего может быть принято решение об отсутствии анализируемого вещества в пробе, в то время как оно на самом деле присутствует, т.е. будет совершена ошибка 2го рода. Следовательно, для оценки рисков ложного срабатывания необходимо оценить вероятности попадания измеренных значений концентрации в указанные интервалы.

В дальнейшем будет предполагаться, что погрешности измерений, о которых говорилось ранее, являются случайными.

Для оценки вероятностей ложного срабатывания в общем случае необходимо знать функцию распределения плотности вероятности концентрации при определенном значении светимости, т.е. светимость и концентрация должны рассматриваться как зависимые случайные вели-

чины. При этом функция распределения плотности вероятности для интенсивности свечения при заданной концентрации с большой точностью может рассматриваться как нормальная, что подтверждается экспериментальными результатами [5]. В то же время функция распределения плотности вероятности (в дальнейшем плотность вероятности) для концентрации при заданной интенсивности свечения в общем случае отличается от нормальной, т.к. значения концентраций получаются из значений светимости с применением нелинейных преобразований, обратных преобразованиям (1), (2).

Для оценки вероятности ошибок первого и второго рода, необходимо выбрать соответствующие гипотезы и критерий принятия или не-принятия нулевой гипотезы. В случае экспресс - тестов гипотезы выбираются следующим образом:

гипотеза H_0 (нулевая): вещество не содержится в исследуемом образце (содержится в концентрации, меньше критической);

гипотеза H_1 : вещество в исследуемом образце содержится в концентрации, больше критической.

Реализация критерия принятия гипотезы в случае использования КК сводится к следующему:

1. с помощью микроанализатора экспериментально измеряется светимость $I(n)$ как функция стандартных разведений, т.е. определяется набор точек $\bar{I}_k(n_k)$, принадлежащих этой функциональной зависимости;

2. с использованием полученных экспериментальных данных по методике [3] строится КК, по которой в дальнейшем определяется значение концентрации n анализируемого вещества в пробе;

3. если, как уже было отмечено выше, полученное значение меньше критического $n_{кр}$, то принимается гипотеза H_0 , в противном случае принимается конкурирующая гипотеза H_1 .

Оценка вероятностей ошибок 1го и 2го рода основана на нахождении плотности распределения условной вероятности $p(n | I = I_k)$ для концентрации определяемого вещества при светимости I_k аналитической зоны тест-полоски. Отметим, что I_k отвечает любому значению светимости, соответствующему k -му измерению концентрации анализируемого вещества, в том числе и среднему значению по многократным измерениям.

Как уже говорилось, концентрация и светимость рассматриваются как зависимые случайные величины с плотностью вероятности совместного распределения двух случайных величин $p(n, I)$.

Можно показать, что плотность распределения условной вероятности для концентрации определяемого вещества при заданной светимости тест-полоски может быть записана в виде

$$p(n | I = I_k) = \frac{p(I | n) \cdot p(n)}{\int_{-\infty}^{+\infty} p(I | n) \cdot p(n) \cdot dn} \Bigg|_{I=I_k}, \quad (3)$$

где $p(I | n)$ - плотность распределения условной вероятности светимости при заданной концентрации n , имеющая нормальный закон распределения,

т.е.

$$p(I | n) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma(n)} e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}, \quad (4)$$

в свою очередь, $\bar{I}(n)$ - среднее значение светимости (математическое ожидание) по результатам многократных измерений, выполненных на наборе тест-полосок одного типа, $\sigma^2(n)$ - дисперсия (разброс) значений светимости относительно среднего значения, являющаяся в общем случае функцией концентрации n (неравноточные измерения);

$p(n)$ – плотность распределения вероятности концентрации.

Для нахождения интересующей нас плотности распределения вероятности $p(n | I = I_k)$, определяемой формулой (3), необходимо знать плотность распределения вероятности концентрации $p(n)$, поскольку плотность вероятности $p(I | n)$ известна (формула (4)).

В предлагаемой работе распределение вероятности $p(n)$ предполагается равномерным во всей области ее определения ввиду отсутствия какой-либо априорной информации о ней.

Это означает, что для прямой зависимости

$$p(n) = \begin{cases} \frac{1}{n_{\max} - n_{\text{нор}}}, & \text{если } n \text{ принадлежит области определения,} \\ 0, & \text{если } n \text{ не принадлежит области определения} \end{cases} \quad (5)$$

и

$$p(n) = \begin{cases} \frac{1}{n_{\text{нор}}}, & \text{если } n \text{ принадлежит области определения,} \\ 0, & \text{если } n \text{ не принадлежит области определения} \end{cases} \quad (5')$$

для обратной зависимости.

Здесь $n_{\text{нор}}$ - пороговый уровень концентрации, начиная с которого начинает наблюдаться сигнал светимости при прямой зависимости и, начиная с которого, перестает наблюдаться сигнал светимости при обратной зависимости, n_{\max} - максимально возможная по медицинским и биологическим основаниям концентрация анализируемого вещества в пробе. Это в свою очередь означает, что интегрирование в знаменателе формулы (3) должно проводиться не от $-\infty$ до $+\infty$, а на интервале $[n_{\text{нор}}, n_{\max}]$ для прямой зависимости и на интервале $[0, n_{\text{нор}}]$ – для обратной.

При оценке рисков ложного срабатывания как вероятности попадания измеренных концентраций в те части интервалов, где возможно возникновение ошибок 1го и 2го рода, необходимо в соответствии с формулой (3) вычислить площадь под функцией распределения плотности вероятности для светимости на интервале концентраций, где возможно совершить ошибку контроля.

Исходя из этих соображений, оценку рисков ложного срабатывания можно провести с помощью написанных ниже формул.

Для прямой зависимости

$$P_{\alpha}(n) = \int_{n_{сп}}^{n_k + \Delta n_k} p(n | I = I_k) dn = \frac{\int_{n_{сп}}^{n_k + \Delta n_k} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn}{\int_{n_{нор}}^{n_{max}} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}, \quad (6)$$

$$P_{\beta}(n) = \int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{сп}} p(n | I = I_k) dn = \frac{\int_{n_{сп}}^{n_k - \Delta n_k} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn}{\int_{n_{нор}}^{n_{max}} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}, \quad (7)$$

где $P_{\alpha}(n)$ – вероятность ошибки 1го рода, $P_{\beta}(n)$ – вероятность ошибки 2го рода,

$I(n) = \bar{I}(n_k)$ – калибровочная кривая, построенная по средним значениям светимости, которая для прямой зависимости (сэндвич анализ) имеет вид $I(n) = A(1 - e^{-B \cdot n})$ (см. формулу (1)).

Для обратной зависимости

$$P_{\alpha}(n) = \int_{n_{сп}}^{n_k + \Delta n_k} p(n | I = I_k) dn = \frac{\int_{n_{сп}}^{n_k + \Delta n_k} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn}{\int_0^{n_{нор}} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn} \Bigg|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}, \quad (8)$$

$$P_{\beta}(n) = \int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{xp}} p(n | I = I_k) \cdot dn = \frac{\int_{n_k - \Delta n_k}^{n_{xp}} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn}{\int_0^{n_{nop}} \frac{e^{-\frac{(I(n) - \bar{I}(n))^2}{2\sigma^2(n)}}}{\sigma(n)} dn} \Big|_{I(n) = \bar{I}(n_k)}, \quad (9)$$

где $P_{\alpha}(n)$ – вероятность ошибки 1го рода, $P_{\beta}(n)$ – вероятность ошибки 2го рода,

$I(n) = \bar{I}(n_k)$ – калибровочная кривая, построенная по средним значениям светимости, которая для обратной зависимости (конкурентный метод) имеет вид $I(n) = A \cdot e^{-B \cdot n} + C$, (см. формулу (2)).

Для проведения численных оценок с помощью (6) – (9) необходимо знать в явном виде функциональные зависимости $\bar{I}(n)$ и $\sigma^2(n)$.

Что касается зависимости $\bar{I}(n)$, то, как уже неоднократно отмечалось, ее значения при стандартных разведениях n_k известны из эксперимента по построению КК, а значения при других концентрациях определяются по КК. Значения $\sigma(n)$ определяются из аппроксимационных кривых, используемых при построении верхней и нижней характеристик, о которых говорилось ранее.

Иной подход к проведению численных оценок основан на известном в метрологии методе обработки неравноточных измерений [8], использующем с помощью экспериментальных данных вычисления весовых коэффициентов и определение средневзвешенных среднего значения и дисперсии. Этот подход в данной работе не использовался.

Таким образом, в формулах (6) – (9) все переменные и параметры известны из эксперимента и аппроксимационных зависимостей, что позволяет графически построить зависимость вероятностей рисков ложного срабатывания от измеренных с помощью КК значений концентрации (см. рис. 3, к обсуждению которого мы еще вернемся).

При вычислении плотности вероятности $p(n|I=I_k)$ можно использовать также численный метод расчета.

Исходными данными для такого расчета являются КК и уже упоминавшиеся верхняя и нижняя характеристики, поскольку они определяют как распределение плотности вероятности, так и погрешность измерения концентрации. Для численного нахождения распределения плотности вероятности концентрации на примере обратной зависимости (конкурентного метода), полученной при измерении светимости тестовых полосок, вызванной присутствием бензодиазипина в пробе, выполняется следующая последовательность действий.

1. Интервал концентраций разбивается на N равных отрезков. Каждому левому концу отрезка на КК соответствует значение концентрации n_k и светимости I_k . С помощью верхней и нижней характеристик определяются два интервала: интервал $[I_k - \Delta I_k, I_k + \Delta I_k]$, отвечающий погрешности измерения светимости, и интервал $[n_k - \Delta n_k, n_k + \Delta n_k]$, отвечающий погрешности определения концентрации методом КК (см. рис. 1). Далее в каждой точке разбиения генерируется набор из M значений светимости, распределенных по нормальному закону со средним значением, лежащим на КК, и СКО, вычисляемым по формуле

$$\sigma = \frac{\Delta I_k}{2}, \quad (10)$$

где ΔI_k - погрешность измерения светимости.

Такая запись для СКО обусловлена тем, что с доверительной вероятностью $P=0,95$, распределенные по нормальному закону и ограниченные верхней и нижней характеристикой значения светимости, оказываются внутри интервала шириной 4σ .

Генерация набора значений светимости по нормальному закону означает, что «густота» значений светимости (число точек, приходящихся на единицу длины по оси светимости) на прямой, отвечающей

значение (частота появления) концентрации, найденное описанным выше образом. Подобная процедура выполнялась для каждого интервала разбиения оси светимости на равные интервалы. В результате было получено искомое распределение плотности вероятности $p(n|I=I_k)$, график которого приведен на рис. 2.

Знание распределения плотности вероятности концентрации позволяет с помощью формулы (3) оценить вероятности ошибок 1го и 2го рода. С этой целью массив данных по распределению плотности вероятности, найденный в предыдущем пункте, ранжируется по возрастанию концентраций, т.е. данные располагаются следующим образом

$$[n_1; p_1], [n_2; p_2], \dots, [n_j; p_j], \dots, [n_N; p_N], \quad (12)$$

где $n_1 < n_2 < \dots < n_j < \dots < n_N$, p_j - частота появления значений концентраций n_j , рассчитанных по п. 2. В массиве (12) интервалу концентраций $\Delta n_j = n_{j+1} - n_j$ будет соответствовать частота появления p_j в этом интервале j -го значения концентрации.

Ошибка 1го рода возникает в случае, когда часть значений концентрации будет больше критического значения, в то время как максимальная частота появления концентрации p_{\max} будет меньше критической. В этом случае для прямой зависимости формула для нахождения вероятности ошибки 1го рода определяется выражением (см. формулу (6))

$$P_\alpha = \frac{\sum_{n_{сп} \leq n_j \leq n_k + \Delta n_k} \Delta n_j \cdot p_j}{\sum_{n_{нор} \leq n_j \leq n_{\max}} \Delta n_j \cdot p_j}, \quad j = 1, \dots, N-1. \quad (13)$$

Для вероятности ошибки 2го рода (см. формулу (7))

$$P_\beta = \frac{\sum_{n_k - \Delta n_k \leq n_j \leq n_{сп}} \Delta n_j \cdot p_j}{\sum_{n_{нор} \leq n_j \leq n_{\max}} \Delta n_j \cdot p_j}, \quad j = 1, \dots, N-1. \quad (14)$$

Для обратной зависимости вероятность ошибки 1го рода (см. формулу (8))

$$P_{\alpha} = \frac{\sum_{n_{сп} \leq n_j \leq n_k + \Delta n_k} \Delta n_j \cdot p_j}{\sum_{0 \leq n_j \leq n_{max}} \Delta n_j \cdot p_j}, \quad j = 1, \dots, N-1, \quad (15)$$

вероятность ошибки 2 го рода (см. формулу (9))

$$P_{\beta} = \frac{\sum_{n_k - \Delta n_k \leq n_j \leq n_{сп}} \Delta n_j \cdot p_j}{\sum_{0 \leq n_j \leq n_{max}} \Delta n_j \cdot p_j}, \quad j = 1, \dots, N-1. \quad (16)$$

По полученным значениям P_{α}, P_{β} строится график зависимости вероятности получения ложных результатов анализа от концентрации. На рис.3 изображен график, полученный по формулам (15), (16) для бензодиазепина.

Следует отметить, что отличие на рис. 3 результатов графического построения по формулам (8), (9) от результатов численного расчета по формулам (15), (16) обусловлено, по сути, разными методами численной оценки интересующих нас вероятностей.

Вероятности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов измерения концентраций методом КК могут быть также оценены на основе подхода, при котором метод КК рассматривается как метод косвенных измерений.

В самом деле, например, из прямой зависимости (1) получаем следующее выражение для вычисления погрешности измерения концентрации

$$\Delta n = \frac{\Delta B}{B} n + \frac{\Delta A}{A \cdot B} + \frac{\Delta I + \Delta A}{(A - \bar{I}(n))B}. \quad (15)$$

Из обратной зависимости (2):

$$\Delta n = \frac{\Delta B}{B} n + \frac{\Delta I + \Delta C}{B \cdot (\bar{I}(n) - C)} + \frac{\Delta A}{AB}, \quad (16)$$

где $\Delta A, \Delta B, \Delta C$ - погрешности вычисления коэффициентов аппроксимирующих функций, A, B, C - численные коэффициенты, рассчитанные в

соответствии с [3], [4], ΔI - погрешность измерения светимости тестовой полоски.

В полученных выражениях все величины, стоящие в правых частях, известны из аппроксимационных расчетов и эксперимента. Таким образом, определяется интервал значений концентрации $[n - \Delta n, n + \Delta n]$ относительно «измеренного» по КК значения концентрации n . Поскольку функция распределения плотности вероятности концентрации в общем случае неизвестна, то, как принято в метрологии, внутри интервала она предполагается равномерной. Если при этом измеренное значение $n > n_{кр}$, а левый край упомянутого выше интервала попадает в область слева от $n_{кр}$ ($n - \Delta n < n_{кр}$), то возможно получение ложноотрицательного результата анализа. Вероятность ошибки 2го рода в этом случае будет пропорциональна длине отрезка интервала концентраций, лежащего в области слева от $n_{кр}$, т.е.

$$P_{\beta}(n) = \frac{n_{кр} - [n - \Delta n]}{2\Delta n}. \quad (17)$$

График зависимости вероятности ложноотрицательного результата (ошибки 2го рода) от концентрации имеет вид линейной зависимости с максимумом, равным 0,5, когда $n = n_{кр}$, и минимумом, равным нулю, когда $n - \Delta n = n_{кр}$ (см. рис. 3). Аналогичный вид имеет и график зависимости ложноположительных результатов от определенной по КК концентрации, при этом вероятность ложноположительного результата (ошибки 1го рода) определяется выражением

$$P_{\alpha}(n) = \frac{[n + \Delta n] - n_{кр}}{2\Delta n}. \quad (18)$$

Оценки вероятностей ошибочных результатов анализа, даваемые двумя последними формулами, справедливы как для прямой, так и для обратной зависимости концентрации от светимости. Специфика зависи-

мости концентрации от светимости, зависящая от метода иммунного анализа отражается только в форме и параметрах функциональных зависимостей погрешности измерения концентрации от влияющих факторов.

Как уже отмечалось, оценки рисков ложного срабатывания, найденные всеми тремя методами, получены в предположении, что суммарная погрешность измерения концентрации методом КК определяется только случайной составляющей. Графики таких оценок представлены на рис 3, где часть графика, расположенная левее критического значения относится к вероятности ошибок 1го рода, правее – к вероятности ошибок 2 го рода.

К сожалению, в реальном эксперименте суммарная погрешность измерения концентрации серьезно отягощена неисключенной систематической составляющей. Наиболее просто учесть влияние систематической составляющей погрешности можно методом, основанным на косвенных измерениях. При этом можно показать, что ширина области концентраций, где возможны ошибочные результаты анализа, равна $2 \Delta l$.

Если снова обратиться к рисунку 3, то можно заметить, что различие в оценках рисков ложного срабатывания, найденных всеми вышеописанными способами невелико: результаты при уровне вероятности 0,1 и более практически совпадают.

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Количественные тест-системы можно и целесообразно применять для экспресс - диагностики в области медицинских исследований на стадии первичных анализов.

2. Разработанные методы дают возможность поставить в соответствие каждому единичному результату измерений концентрации риск ложного срабатывания теста, что позволит врачу объективно принять решение о необходимости повторной диагностики.

3. Предложенные методы оценки рисков ложного срабатывания можно использовать и для других видов функциональных зависимостей, используемых при построении КК.

4. Для оценки рисков ложного срабатывания тест-систем в случаях, когда систематическая составляющая погрешности пренебрежимо мала по сравнению со случайной, рекомендуется к применению способ, основанный на расчетах по формулам (6) - (9).

5. Для оценки рисков ложного срабатывания количественных тест-систем при значительной систематической погрешности по сравнению со случайной целесообразно применять метод, основанный на оценке результатов косвенных измерений.

Повышение достоверности оценки рисков ложного срабатывания возможно за счет уменьшения погрешности построения КК, т. е. следует стремиться к тому, чтобы эта погрешность в основном определялась случайной составляющей, например, за счет снижения методической погрешности приготовления стандартных разведений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Государственный контракт 120/170 от 26 мая 2011 г. в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры nanoиндустрии в Российской Федерации на 2008-2011 годы») и Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт № 16.512.11.2125 от 20 февраля 2011 г. в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы»).

Авторы благодарят А.В. Жердева за полезные обсуждения и проявленный интерес к проблеме оценки рисков ложного срабатывания.