

## НЕОБЫЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И РОЛЬ ЭНДОКРИНОЛОГА-КЛИНИЦИСТА

*Подготовка публикации и перевод В.А. Вороненко*

*По материалам статьи Jones A.M., Honour J.W. Unusal results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist // Clinical Endocrinology. 2006. V. 64. P. 234–244.*

Журнал “КЭТ” стремится представить читателям информацию, важную в повседневной работе врача. Наше внимание эта статья привлекла именно потому, что практический врач нередко воспринимает как некую **абсолютную истину** большинство получаемых из лаборатории результатов, касающихся уровней того или иного гормона, не задумываясь над тем, как велика потенциальная роль ошибок как на преаналитическом, так и на аналитическом этапе работы лаборатории.

Внедрение иммунологических методов для определения уровня гормонов в 1960-х годах произвело революцию в эндокринологии. Раньше для определения концентраций гормонов использовались биологические и химические методы, которые обладали различной специфичностью, были весьма трудоемки и требовали использования больших объемов биологических жидкостей или тканей. Иммунологические методы основаны на выявлении определенных молекул с помощью антител. Поликлональные антитела получают от многих животных. Например, широко используются мышинные моноклональные антитела. В настоящее время вместо изотопов, как правило, применяют флуоресцентные хемилюминесцентные маркеры или ферментные реакции. Не все иммунологические методы основаны на отделении антителосвязанных элементов. Иммунологические анализы обладают такой специфичностью и чувствительностью, что их результаты в целом заслуживают доверия. Однако в некоторых ситуациях один или несколько результатов противоречат данным физического обследования пациента или клинической картине заболевания в целом. Клиницисты должны знать о том, что иммунологический анализ не всегда дает правильный ответ и требует определения характера поражения. Запрос на проведение анализа имеет своей целью **подтверждение клинического диагноза**. При этом о любых расхождениях данных по пациенту необходимо сообщить в лабораторию.

Неожиданные результаты анализов, как правило, обусловлены влиянием эндогенных и экзогенных факторов. Мы в настоящее время знаем о суще-

ствовании множества подобных феноменов. Эти факторы можно выявить и устранить их влияние, но следует учитывать, что они могут иметь различное значение у разных пациентов и даже у одного и того же пациента в разное время. Недостаточная специфичность антител приводит к ложноположительным результатам. В то же время изменение методики проведения анализа может привести к ложноотрицательным результатам. Свое влияние могут оказывать и внешние факторы, в том числе еще до проведения анализа, например во время взятия материала. В этом случае также можно изменить результат путем использования других методик. Следует не игнорировать расхождений, а стремиться объяснить их, чтобы избежать недоразумений при установлении диагноза и выборе метода лечения, а также трат на проведение дополнительных и, возможно, бессмысленных в данной ситуации анализов. В лабораториях используется ряд схем по контролю качества рутинных анализов, целью которых является обнаружение систематических ошибок. Чтобы достичь успеха, эти схемы необходимо применять своевременно. Схема определения может быть ориентирована на проведение специального анализа для выявления ошибочных результатов в аберрантных выборках пациентов. В решении этих проблем врачи-клиницисты могут сыграть важную роль. Зная о существовании определенных проблем, связанных с проведением этого анализа, лаборатория может принять меры для получения максимально точного результата. Воздействие любого фактора может привести к неверным результатам исследования, на котором основываются диагноз и тактика ведения больного. В литературе приводится много подобных данных. В таблице 1 представлен ряд примеров. В некоторых случаях неправильные данные приводили к судебным разбирательствам. Клиницисты должны знать о том, что с помощью анализатора не всегда можно наилучшим образом измерить уровень наиболее важного для диагноза гормона. Например, лечение витамином D<sub>2</sub> не всегда можно распознать с помощью специального анализа 25-ги-

**Таблица 1.** Ошибки в тактике ведения больных при неправильном определении уровня гормонов

Повышение	Последствия ошибки
Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (указывает на опухоль половых желез) Кальцитонин (указывает на медуллярный рак щитовидной железы) Пролактин  Свободный кортизол в моче Повышение уровня тестостерона у женщин Отрицательный результат STAT ХГЧ при беременности  Повышение уровня ЛГ и ФСГ Снижение уровня инсулина инсулиномы	Операция, химиотерапия Тонкоигольная биопсия Затруднение при диагностике пролактиномы Дополнительные исследования Дополнительные исследования Неадекватное лечение хорионкарциномы Дополнительное обследование Затруднение при диагностике
Повышение и понижение	Последствия ошибки
Ошибка при определении уровня ТТГ и Т4 Ложноположительные и ложноотрицательные результаты исследования уровня тропонина Снижение уровня 25-гидроксивитамина D, несмотря на замещение Rx	Неадекватное лечение Дополнительное обследование или лечение инфаркта миокарда (ИМ) Ошибочная диагностика гиповитаминоза D

дроксивитамина D. Несмотря на то что иммунологический анализ как метод диагностики обладает достаточной гибкостью и специфичностью, его достоверность в сравнении с другими автоматизированными технологиями, используемыми в биохимическом анализе, заслуживает особого внимания.

### **Факторы, действующие до проведения анализа**

Правильная интерпретация результатов анализа зависит от большого числа факторов, начиная с соблюдения пациентом правил подготовки к сдаче анализа и заканчивая правильностью собственно взятия материала. Если вы сомневаетесь в правильности взятия анализа, обратитесь в лабораторию. Направление на анализ должно предоставлять врачу-лаборанту информацию о возрасте, поле, национальности пациента, наличии беременности и стадии менструального цикла. Существенные трудности представляет интерпретация гормональных исследований в период новорожденности.

### **Время взятия анализа**

Время взятия анализа должно быть зафиксировано в направлении для правильной оценки его результатов. Циркадианные ритмы продукции многих гормонов были детально изучены, в особенности это относится к АКТГ и кортизолу. Такой же тип секреции характерен для пролактина и альдостерона. Выброс тестостерона также достигает своего пика в утреннее

время и постепенно снижается до минимума к 20.00. У мужчин уровень тестостерона снижается с возрастом (на 40% с 20 до 70 лет). Это снижение маскируется подъемом уровня ГСПГ (глобулина, связывающего половые гормоны) и общим повышением уровня свободных андрогенов. С возрастом, как у мужчин, так и у женщин, уменьшается содержание других гормонов, в том числе дегидроэпиандростеронсульфата и эстрадиола (после 50 лет). На концентрацию многих гормонов оказывают влияние беременность и фаза менструального цикла. Эти факторы влияют на содержание ХГЧ, человеческого плацентарного лактогена и эстрадиола. При беременности повышается уровень ГСПГ, что связано с ростом концентрации эстрадиола и повышением уровня общего кортизола и тиреоидных гормонов. Различные факторы оказывают влияние на концентрации гормон-связывающих белков и альбумина и соответственно на содержание связанных, свободных и общих форм гормонов.

### **Подготовка пациента**

Особенности состояния пациента могут оказать влияние на уровни некоторых гормонов. Например, это характерно для пациентов с эутиреозом при тяжелых соматических заболеваниях. Инфекционные процессы, гематологические и аутоиммунные нарушения несколько менее значимые факторы, которые тем не менее могут оказывать влияние на уровень некоторых гормонов. Другие факторы, связанные с подго-

товкой пациента к сдаче анализа (положение тела, прием пищи, время последнего приема лекарств, медицинские манипуляции, пропуск очередного приема лекарств), могут иметь решающее значение для правильной интерпретации результатов тестов, и может потребоваться изменение некоторых из этих показателей в том случае, если полученные результаты не будут иметь смысла с учетом клинических данных. Усилению образования некоторых гормонов, например гормона роста, пролактина, кортизола и ренина, могут способствовать физическая нагрузка и стресс. Длительный стресс, в том числе хирургическое вмешательство, может оказать влияние на уровень белков-переносчиков, в том числе трансферрина и ферритина, а также привести к снижению уровня тиреоидных гормонов. Концентрация многих элементов плазмы изменяется в зависимости от времени, прошедшего после последнего приема пищи. Для лучшей стандартизации результатов целесообразно брать анализ натощак. В особенности это касается инсулина, гастрина и кальцитонина. Переход из горизонтального положения в вертикальное приводит к перемещению ультрафильтра из сосудов во внесосудистое пространство. Результатом этого является повышение концентрации крупных молекул (пептидов, ферментов и других белков) и тех веществ, которые с ними связаны. Меняется концентрация кортизола, тироксина и лекарственных препаратов. Следует отметить, что результаты исследования уровня некоторых гормонов у пациентов при взятии крови в положении сидя нельзя сопоставлять с данными анализов, взятых у госпитализированных пациентов, которые могли до этого длительно пребывать в горизонтальном положении. Наибольшее значение имеет влияние положения тела на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему. Анализ крови на активность ренина и уровень альдостерона рекомендуется брать после того, как пациент хотя бы немного времени проведет в горизонтальном положении. Обследование амбулаторных пациентов требует наличия стандартизованных протоколов, которые были бы доступны и выполнялись врачами. Скрининг-тесты на наличие первичного гиперальдостеронизма основаны на определении соотношения концентраций альдостерона и ренина.

### Лекарственные препараты

Лекарственные препараты могут влиять на результаты анализов, взаимодействуя либо с исследуемым веществом *in vivo*, либо с веществами, участвующими в иммунологической реакции *in vitro*. Антитела могут реагировать не только с анализируемым веществом (перекрестная реакция). Зная особенности метода, мы можем предугадать, каков будет характер такой

реакции. Однако в настоящее время в коммерческих тест-системах редко указывается химическая природа гаптенных, лигандов или других используемых в анализе реагентов. Отмечаются перекрестные реакции со стороны многих лекарственных препаратов и их метаболитов, особенно когда проводится иммунологический анализ содержания стероидных гормонов. Такие препараты, как гепарин, могут влиять на концентрацию тиреоидных гормонов. Биотин применяется пациентами редко. Однако было показано, что он влияет на результаты иммуноферментного анализа содержания ТТГ и св. Т4. В направлении следует отметить использование радиоизотопов и флюорофореа, несмотря на то, что это повлияет только на те анализы, в которых эти вещества используются как соответствующие маркеры. Взаимодействия *in vivo* весьма многочисленны. Наиболее известно действие оральных контрацептивов, которые увеличивают содержание гормон-связывающих белков за счет своего эстрогенного действия. Амидарон может влиять на уровень тиреоидных гормонов, вызывая как его увеличение, так и снижение. В направлении должны быть указаны все применяемые препараты с тем, чтобы любое отклонение в результатах исследования можно было бы оценить с учетом используемых препаратов.

### Забор материала

Наиболее часто содержание гормонов оценивается в плазме, сыворотке крови и в моче. В каждом случае исследуется комплекс, состоящий из клеток, белков, углеводов, липидов, метаболитов и солей. С учетом этого вязкость изучаемой среды у разных пациентов будет различной. Пробирки для взятия крови представляют собой сложные устройства, содержащие силиконовые масла и другие компоненты; так что иногда они могут быть непригодны для общеклинических анализов. Пробирки для хранения крови с целью последующего исследования плазмы, как правило, содержат антикоагулянт, конечная концентрация которого определяется объемом взятой крови. По возможности пробирка должна быть заполнена до необходимого уровня. При сборе суточной мочи емкость для сбора или заморозки также может содержать консервант. Данные по конкретным анализам должны приводиться в руководствах по лабораторным исследованиям или предоставляться самой лабораторией, проводящей анализ.

### Кровь

Цельная кровь редко применяется для проведения анализов, за исключением скрининга у новорожденных и определения содержания циклоспорина А. Основная проблема, связанная с проведением

иммунологического анализа цельной крови, заключается в наличии в ней клеточных ферментов, в том числе протеаз, гидролаз и ферментов, вырабатывающих свободные радикалы, что может отразиться на результатах анализа, особенно при применении методов, основанных на использовании ферментов.

Состояние многих анализируемых веществ остается стабильным при нахождении в цельной крови, хотя это и не всегда так. Уровень ингибина А значительно снижается даже при кратковременном хранении цельной крови под действием эритроцитарной каталазы в определенных исследованиях, основанных на использовании ферментов. Гомоцистеин находится в нестабильном состоянии в крови и должен быть выделен и заморожен в течение 1 ч после взятия крови для предотвращения превращения S-аденозилметионина и S-аденозилгомоцистеина в гомоцистеин, а также его спонтанного высвобождения из клеток в плазму крови с течением времени и при определенной температуре. Однако при добавлении ингибиторов этих процессов к цельной крови вскоре после ее взятия можно добиться значительно большей стабильности этих веществ. Некоторые гормоны, представляющие собой низкомолекулярные полипептиды, например АКТГ, глюкагон, гастрин и другие гормоны ЖКТ, быстро разрушаются под действием ферментов крови. Для их сохранения может потребоваться добавление в пробирки, содержащие кровь, соответствующих антипротеолитических препаратов типа трасилола (апротинин). И даже в этом случае кровь нужно подвергнуть центрифугированию при низкой температуре в течение 10 мин после ее взятия, а затем немедленно заморозить полученную плазму или сыворотку при температуре -20 °С для дальнейшего хранения. (Это **чрезвычайно важный момент**, несоблюдение которого — частый источник ошибок при проведении исследований в нашей стране.) Необходимо оценить стабильность исследуемых веществ при их повторных замораживаниях и размораживаниях при взятии анализов у группы пациентов.

### Плазма

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) часто используется как антикоагулянт, в особенности при определении уровня гормонов. После прекращения контакта с клетками для определения содержания большинства гормонов плазму можно хранить при температуре +4 °С в течение 120 ч. ЭДТА является сильным хелатирующим агентом и связывает ионы металлов, в том числе являющиеся кофакторами ферментов, особенно в случае неполного заполнения пробирки кровью. Как ЭДТА, так и цитрат связывают меченые атомы европия, что приводит к более высоким пока-

зателям при проведении конкурентного и более низким — при проведении неконкурентного флюорометрического анализа. В качестве антикоагулянта также можно использовать литий-гепарин, хотя он может снижать частоту реагирования некоторых антител с лигандом. Также, за исключением некоторых методов иммуноферментного анализа, допускается использование фторида натрия. Присутствие фибриногена в несвернувшейся плазме, так же как и наличие в ней парапротеинов, может привести к тому, что плазму становится труднее перенести с помощью пипетки.

### Сыворотка

Использование сыворотки позволяет решить проблемы, связанные с применением антикоагулянтов и наличием в плазме фибриногена. Именно сыворотка является средой выбора для проведения почти всех иммунологических исследований с учетом ее стабильности и возможности хранения наиболее часто исследуемых веществ даже при температуре +4 °С. **Важным исключением** является **паратгормон**, который **более** устойчив в плазме при ее заморозке не позднее 30 мин после взятия анализа. Несмотря на то что сыворотка сама по себе является подходящей средой для определения содержания многих веществ, использование пробирок с отделением сыворотки на “гелевой” основе приводит к изменению результатов некоторых иммунологических исследований. Ранее сообщалось, что кровь, собранная в такие пробирки, непригодна для **определения** содержания **ряда** белков и пептидов сыворотки на аппарате DPC Immulite и вызывает повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) при использовании некоторых методов, поскольку гель абсорбирует некоторые из макромолекул, образующие комплексы с СРБ. Сообщалось, что концентрация прогестерона снижалась на 50% от исходного уровня в случае хранения сыворотки в гель-содержащей пробирке в течение 6 дней.

**Пластификатор**, три(2-бутоксипропил)фосфат (ТБЭФ) является мощным ингибитором связывания ряда лекарств с белками. В прошлом это вещество находили в ограничителях ряда систем забора крови, что приводило к изменению содержания ряда протеин-связанных веществ. При измерении содержания исследуемых веществ, которые могут всасываться гелем, важно также, из какого материала сделана сама пробирка. Примером может служить АКТГ, который подвергается абсорбции на стекле.

**Гемолиз и гипербилирубинемия** влияют на результаты иммунологических исследований меньше, чем на результаты фотометрических методов. Однако вещества, образующиеся в результате гемолиза в боль-

шей степени, чем гемоглобин, могут оказывать влияние на результаты анализа за счет высвобождения клеточных ферментов и других путей взаимодействия с клеточными структурами. Даже незначительный гемолиз недопустим в первую очередь потому, что высвобождение протеолитических ферментов приводит к разрушению низкомолекулярных пептидов, в частности инсулина, глюкагона, кальцитонина, ПТГ, АКТГ и гастрин.

**Липидемия** оказывает влияние на турбидиметрическую конечную точку. Так, было четко показано изменение содержания свободного тироксина в условиях повышения концентрации свободных жирных кислот. Это связано с тем, что жирные кислоты конкурируют с Т4 за участки связывания белков, что может, в зависимости от типа анализа, привести к появлению ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Свободные жирные кислоты и хиломикроны также могут повлиять на результаты исследования жирорастворимых веществ, в частности стероидов, поскольку они могут абсорбировать эти полярные вещества на своей поверхности и не допускать тем самым их связывания.

### **Влияние гормон-связывающих белков**

В той или иной концентрации гормон-связывающие белки представлены в любом взятом образце сыворотки или плазмы. Измерение общей концентрации гормонов требует предварительного отделения гормона от связывающего его участка. Если белок, связывающий как меченые, так и немеченые лиганды, не будет удален или его действие не будет подавлено, между связывающим белком, меченым или немеченым лигандом и анализируемым антителом установится равновесие, которое приведет к неправильным результатам исследования.

На исследованиях может отразиться изменение концентрации специфически связывающих белков при врожденных нарушениях, увеличении их образовании или уменьшении скорости их клиренса. Белок, связывающий гормон роста, может по-разному влиять на определяемый уровень самого гормона роста в зависимости от того, какой метод применяется, так же как и кортикотропин-рилизинг — гормон (КРГ) — связывающий белок при определении уровня КРГ. Изменение содержания кортизол-связывающего белка может привести к неправильному определению уровня прогестерона, эстрадиола, гормона роста и собственно кортизола. Определение уровня св. Т4 позволило, по большей части, решить проблему интерпретирования результатов теста на содержание Т4 в условиях изменения концентрации тироксин-связывающего белка.

Ряд лекарственных препаратов, в том числе фенитоин, карбамазепин и салицилаты, конкурируют с тиреоидными гормонами за связывание с белками сыворотки и могут увеличивать содержание св. Т4. При взятии крови для определения уровня тиреоидных гормонов из вены, в которую ранее вводился фуросемид, последний сходным образом увеличивает содержание св. Т4. Введение гепарина *in vitro* вызывает высвобождение жирных кислот, которые вытесняют тиреоидные гормоны из их связи с белками и, таким образом, увеличивают содержание св. Т4 при использовании равновесных методов измерения его концентрации. Наличие парапротеинов в сыворотке крови может привести к неспецифическому связыванию анализируемого вещества или реагента или отразиться на результатах нефелометрического анализа. Содержание связывающих белков может быть повышено искусственным образом, когда пациент резко переходит в вертикальное положение. Также оно может повышаться вследствие использования жгута при взятии анализа крови.

### **Воздействие антител**

Широко известно, что под влиянием антител изменяются результаты иммунологического анализа. Среди таких антител можно отметить гетерофильные антитела, обладающие специфичностью к нескольким антигенам и включающие такие белки, как ревматоидный фактор (РФ), антитела к клеткам животных (наиболее хорошо описаны антитела НАМА — человеческие антитела к клеткам мыши, которые связываются с используемыми в иммунологических анализах антителами, полученными от животных) и аутоантитела, образующиеся к собственным тканям организма и часто ассоциирующиеся с развитием аутоиммунных заболеваний. Конкретное действие антител зависит от типа используемого анализа и участка связывания антитела с анализируемым веществом. Взаимодействие может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам.

### **Гетерофильные антитела**

Гетерофильные антитела — это группа эндогенных антител, которые вступают в реакции с множеством различных молекул. На сегодняшний день они описаны недостаточно и к тому же отличаются значительной неспецифичностью. Фактор, в ответ на появление которого они вырабатываются, до сих пор не выявлен. Можно предположить наличие связи этих антител с развитием аутоиммунных и других воспалительных заболеваний, но вместе с тем в меньшем титре они присутствуют и у здоровых людей. Они могут оказывать влияние на результаты как конкурентных, так и неконкурентных методов ис-

следования. Причем в последнем случае такое взаимодействие наблюдается чаще. В основе взаимодействия могут лежать разные механизмы, а результаты его могут быть как ложноположительными, так и ложноотрицательными. Примером гетерофильных антител, воздействующих на результаты иммунологического анализа, может служить ревматоидный фактор, который связывается с Fc участком иммуноглобулинов и вызывает стерическое несоответствие участков связывания, тем самым препятствуя присоединению антигена. Ревматоидный фактор в малых концентрациях представлен в 5% случаев в общей популяции и приблизительно у 70% больных ревматоидным артритом. Иммунологические анализы, основанные на применении моноклональных антител, несмотря на их достоверность и простоту, особенно чувствительны к действию гетерофильных антител.

### Антитела к клеткам животных

Некоторые антитела обладают высокой специфичностью и образуются в ответ на иммунизацию. К ним относятся человеческие антитела к клеткам животных (англ. *human anti-animal antibodies* (НААА), которые чаще всего влияют на результат “сэндвич”– иммунологического анализа путем связывания с определяемым антигеном, тем самым приводя к ложноположительному результату исследования. Эндогенные антитела предлагается разделять следующим образом. Антитела следует называть **гетерофильными**, если в анамнезе у пациента отсутствуют сведения о введении иммуноглобулинов животных или других известных иммуногенных веществ, а также показана мультиспецифичность этих антител. Антитела следует относить к группе НААА, если пациенту ранее вводились иммуноглобулины животных и иммуноглобулины от представителей того же вида, материал от которого используется в данном исследовании. Несмотря на то что ряд гетерофильных антител действуют таким же образом, эти антитела согласно определению не следует называть гетерофильными, поскольку они являются специфическими и направлены против конкретных иммуноглобулинов, введенных в ходе иммунизации. Однако такое разделение не всегда удобно с практической точки зрения и редко используется. Встречаемость НААА возрастает с внедрением в практику мышинных моноклональных антител для переноса иммуносцинтиграфических или химиотерапевтических агентов к опухолям, а также с другими лечебными и диагностическими целями. В последнее время использование НААА стало представлять определенную проблему, поскольку многие методы иммунологического анализа основаны на применении мышинных моноклональных антител.

### Аутоантитела

Несмотря на то что аутоантитела являются относительно слабыми антителами, они теснее связываются с определенными антигенами и в то же время обладают меньшим спектром действия по сравнению с гетерофильными антителами. Было показано, что воздействие аутоантител представляет наибольшую проблему при определении уровня тиреоглобулина. Механизм взаимодействия различается при использовании разных методов анализа, но само взаимодействие отмечается в любом случае. В популяции в целом распространенность аутоантител составляет от 4 до 27%. Эти аутоантитела встречаются у 15–30% больных дифференцированным раком щитовидной железы, что не позволяет достоверно оценить уровень тиреоглобулина вне зависимости от используемого метода. Несмотря на то что некоторые из недавно разработанных методов иммунологического анализа имели своей целью сведение к минимуму эффект антител к тиреоглобулину с помощью веществ, блокирующих их действие, даже эти исследования нового поколения не полностью свободны от влияния антител к тиреоглобулину (поскольку вырабатываемые организмом пациента аутоантитела к тиреоглобулину значительно различаются по строению участков молекулы, на которые действуют блокаторы) или от действия других гетерофильных антител.

Было высказано предположение, что у одного на 2,5 тыс. человек, не страдающих заболеваниями щитовидной железы, имеются аутоантитела к T<sub>3</sub> или T<sub>4</sub>. Аутоантитела чаще имеются у пациентов, страдающих заболеваниями щитовидной железы. Однако распространенность аутоантител к тиреоидным гормонам различается по данным различных исследований, вероятно, из-за того, что в них применяются разные методы исследования и по-разному происходит отбор пациентов. Четко показано, что наличие аутоантител к тиреоидным гормонам является важным фактором, влияющим на результаты исследования общего уровня тиреоидных гормонов. Однако оно нечасто оказывает влияние на уровень свободных тиреоидных гормонов. В некоторых исследованиях было показано, что эндогенные аутоантитела оказывают влияние на результаты исследования у 30–40% пациентов, но этот показатель значительно различается по данным разных исследователей. Правда, недавно были опубликованы данные исследования, авторы которого предполагают, что антитела различных типов вызывают клинически значимые отклонения результатов анализов в 0–5% случаев. В других исследованиях приводились как более низкие, так и более высокие значения. Даже если распространенность действительно так низка, следу-

ет учитывать влияние аутоантител на результаты миллионов иммунологических тестов, ежегодно проводимых по всему миру.

### Специфичность антител

Неточность иммунологических тестов связана, прежде всего, с недостаточной специфичностью используемых антител, что приводит к перекрестному реагированию. Это обусловлено тем, что антитела способны связываться с любым антигеном, содержащим соответствующий эпитоп. Таким образом, может измеряться содержание не только исследуемого вещества, но и сходных с ним молекул (табл. 2). В идеале следует определить активный компонент. Период полувыведения собственно гормона и его фрагментов может быть различным. Сотрудники лабораторий должны представлять себе, каким образом тест для определения уровня пролактина реагирует на присутствие макропролактина, и располагать протоколами по решению этой проблемы. Проблема специфичности чаще встречается при использовании молекул с одним участком связывания, поскольку достаточно распознавания одного эпитопа для развития перекрестной реакции.

Использование поликлональных антител связано с большим числом проблем, чем использование моноклональных антител. Гликозилирование, образование димеров или комплексов может замаскировать эпитоп, необходимый для связывания антигена, даже несмотря на сохраняющуюся активность анализируемого вещества.

Несмотря на то что производители обязаны предоставлять информацию о возможных перекрестных реакциях при проведении их методов, эти данные часто относятся только к одному уровню перекрестного реагирования при проведении анализа. Причем реагирующее вещество часто присутствует в нефизиологических концентрациях. В таком случае мы могли бы предполагать одновременное замещение на всех уровнях взаимодействия, что на самом деле редко имеет место. Более корректные результаты можно

получить при оценке взаимодействия на уровне 50% от общей связывающей способности. Возможно, одним из решений проблемы перекрестного реагирования стало бы использование в иммунологическом анализе веществ с двумя участками связывания. В случае, если анализируемое вещество будет иметь два независимых четко определенных эпитопа, специфичность метода значительно возрастет. В то же время такой метод не всегда отличается высокой специфичностью, поскольку может отмечаться неспецифическое связывание, обусловленное наличием множества эндогенных компонентов в крови пациента, в том числе бактериальных антигенов, ревматоидного фактора, или комплемента. Эти компоненты связываются с Fc участком многих антител.

Недостаточная специфичность метода иногда может оказаться полезной. В случае, если инсулинома вырабатывает инсулин в нормальном количестве, но в то же время экспрессирует в большом количестве предшественников инсулина, в частности проинсулин и расщепленные проинсулины, более полезными окажутся исследования с меньшей специфичностью, чем те, в которых будет измеряться только уровень инсулина. Вариабельность структуры ХГЧ также может затруднять определение его содержания, поскольку различные формы ХГЧ (интактный гетеродимерный ХГЧ, свободные  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, соге-фрагмент  $\beta$ -ХГЧ, кислый (гипергликозилированный) и "скрещенный" варианты) повышаются при различных заболеваниях и различных физиологических состояниях. Так, например, при беременности более 95% сывороточного ХГЧ состоит из интактного гетеродимера, и в таком случае при неспособности определять другие формы ХГЧ иммунологический метод по своей сути не будет существенно отличаться от теста на беременность. У мужчин с опухолями, развивающимися из половых клеток, содержание ХГЧ будет повышаться за счет свободных субъединиц или кислого варианта.

### "Хук"-эффект

Установлено, что так называемый "хук"-эффект является причиной ложноотрицательных результатов при проведении иммунометрического ("сэндвич")-анализа при высокой концентрации анализируемых веществ. Это вызвано чрезмерным повышением концентрации анализируемого вещества, что приводит к одновременному связыванию как иммобилизованных, так и выявляющих антител, что, в свою очередь, препятствует образованию необходимых для проведения исследования комплексов из иммобилизованных антител, анализируемого вещества и собственно антител, используемых в методе. Для выявления такой проблемы требуется организа-

**Таблица 2.** Примеры перекрестного реагирования, влияющего на специфичность теста

Реагирующие вещества	Анализируемое вещество
Предшественники инсулина	Проинсулин
Фрагменты	ХГЧ, ПТГ
Варианты ЛГ	Гормон роста
Метаболиты	Стероидные гормоны
Димеры	Гормон роста
Комплексы с белками	Пролактин, тропонин
Связанные молекулы	Стероидные гормоны

ция специальных процедур в самой лаборатории. Врач-клиницист может обнаружить проблему, направляя на исследование пациента, ранее проходившего подобное обследование в другой лаборатории.

### **Выявление и устранение отклонений**

Первый шаг на пути к устранению отклонения при проведении иммунологического анализа — это его выявление. Как правило, отклонения выявляются при несоответствии данных анализа клинической картине. Врач направляет пациента на анализ для подтверждения предполагаемого диагноза. Если результат анализа не позволяет достичь этой цели, следует задаться вопросом о причине. В этом плане клиницист находится в лучшем положении по сравнению с сотрудниками лаборатории, потому что он видит пациента и может понять, что результаты обследования противоречат клинической картине болезни. Таким образом, важно, чтобы клиницист знал или обсудил с персоналом лаборатории, какие используются методы и какие в связи с этим могут встречаться нарушения. Поскольку клинически значимые расхождения встречаются нечасто, врачи должны знать о них и внимательно относиться к расхождениям клинических и лабораторных данных. Следует отдавать предпочтение клиническим данным, а не числам. Врач-клиницист должен не только выявлять возможные расхождения в данных лабораторных анализов, но и информировать о них лабораторию с тем, чтобы были проведены соответствующие исследования и необычные случаи были бы описаны. Также сведения об этих отклонениях должны заноситься в медицинскую документацию пациента. При этом наличие системы, которая предоставляет эту информацию при каждом последующем обследовании пациента, позволит с необходимой осторожностью оценивать результаты каждого последующего обследования. Также было высказано предположение об обучении пациентов по вопросам ограничений и “подводных камней” лабораторных исследований. Пациентам необходимо сообщать врачу о возможных причинах возникновения расхождений с его стороны, например о том, что он содержит домашних животных или недавно подвергался диагностическим или лечебным манипуляциям, что может указать на возможность наличия антител к клеткам животных. Однако практичность этих рекомендаций вызывает сомнение. Возможно ношение пациентами браслетов MedicAlert (специальные браслеты, в которых хранится ключевая медицинская информация о человеке). Важно также, чтобы производители тест-систем получали или имели информацию о возможных отклонениях и публиковали ее. Лаборатория выбирает способ решения данной проблемы

в зависимости от типа отклонения. Если ложный результат связан с экзогенным воздействием, например с использованием несоответствующего консерванта, который мог быть слит в подходящую емкость после взятия анализа крови, а также с недостаточно быстрым проведением центрифугирования, охлаждения или замораживания, гемолизом взятого образца крови, выраженной липидемией в связи с тем, что анализ был взят после приема пищи, тогда при возможности сотрудники лаборатории должны поставить врача в известность, чтобы анализ можно было провести повторно. За этим осуществляется внутренний контроль путем четкого ведения протоколов взятия анализов крови. Повторное взятие анализа должно стать процедурой выбора в тех случаях, когда клиницист знает, что исследуемый материал был взят после проведения процедуры, которая может отразиться на результате, например, при повышении уровня простат-специфического антигена (PSA) после ректального исследования или манипуляций на простате, или что анализ был взят в неправильный момент времени. Если ситуация более необычная, клиницист должен обратиться в лабораторию с вопросом о необходимости использования консервантов или других специальных мер, которые требуется осуществить до или после взятия анализа. Следует также учитывать, какие препараты принимает пациент, и если они могут быть причиной отклонения результатов, препарат следует отменить или заменить. Также важным фактором, влияющим на результаты обследования, может стать стресс. Кроме того, иногда может возникнуть необходимость госпитализировать пациента в вечернее время с тем, чтобы с утра взять материал на анализ сразу же после пробуждения. Лабораторная система ИТ обычно отслеживает изменения результатов анализов пациента (оценка дельта). Эту систему нельзя считать совершенным методом защиты от ошибок, поскольку одни и те же отклонения могли наблюдаться в течение всего периода наблюдения пациента. Отклонение можно заподозрить в том случае, если результат существенно отличается от других результатов для пациента за все время и это изменение не сопровождается изменениями клинической картины. Если результат анализа не соответствует норме, можно задать системе ИТ параметры, при которых требуется дальнейшее исследование материала, с тем, чтобы эта система автоматически запрашивала проведение повторного анализа или других дополнительных тестов. Например, при повышении уровня тестостерона у женщин программа будет автоматически подавать запрос на определение уровня андростендиона и/или ДЭАС. Именно эндокринолог-клиницист располагает наилучшими возможностями для выявления отклоне-

ний результатов анализов. В то же время было показано, что влияние эндогенных антител изменяется с течением времени и может быть преходящим.

Иногда содержание одного гормона связано с содержанием другого, например: при низком уровне св. Т4 следует ожидать повышения ТТГ. Если такая связь в норме присутствует, но она не выявляется у данного пациента, следует исключить плохую приверженность проводимой заместительной терапии и другие возможные причины, а при отсутствии таковых предположить возможность отклонения. При проведении иммунологических анализов многие виды взаимодействия бывают связаны с эффектами эндогенных антител. Именно этот тип отклонения бывает труднее всего выявить, поскольку влияние антител продолжается на протяжении длительного времени. Действие эндогенных антител часто носит нелинейный характер, поэтому проще всего выявить их наличие после разведения анализируемого материала. Нелинейный ответ на разведение обычно указывает на эффекты антител. Однако не всегда при действии антител отмечается нелинейный характер реакции после разведения. Кроме этого, нелинейный ответ может быть связан с другими причинами, например гетерогенной природой анализируемого вещества. В частности, это характерно для гетеродимера ХГЧ, существующего во многих молекулярных формах. Другие возможности лабораторного исследования представлены в таблице 3. Если различные методы исследования приводят к одному и тому же результату, нельзя исключить отклонение, поскольку один и тот же фактор может действовать во всех случаях. Иногда требуется дополнительная обработка исследуемого материала до проведения иммунологического анализа. В настоящее время для выявления или удаления гетерофильных антител, как правило, используется блокада неиммунной сывороткой, полученной от представителя того же вида, антитела которого применялись в анализе. В некоторых случаях можно использовать материал от других видов животных. Часто одного разведения или использования блокаторов достаточно, чтобы убрать противоречие в результатах. В одном исследовании в 79% образцов с предполагаемым отклонением оно было подтверждено при использовании блокаторов антител, и только в 21% отклонение было подтверждено при разведении. Получение сходных результатов при использовании нескольких методов не исключает отклонения, а только несколько снижает вероятность его наличия. В то же время на основании расхождения в результатах нескольких тестов можно сделать вывод о наличии расхождения.

Альтернативный метод предотвращения отклонений, обусловленных действием антител к клеткам

животных, появившихся в результате использования животных иммуноглобулинов в лечебных целях, заключается в том, чтобы предупреждать образование антител путем лечения пациентов иммуносупрессивными препаратами, например циклоспорином А, до, во время и после введения антител.

## Выводы

Опубликованные материалы, посвященные этой теме, подтверждают тот факт, что, несмотря на все усилия, проблема отклонения результатов иммунологических анализов остается в силе. Какова будет судьба тех методов анализа, которые сейчас могут давать неправильные результаты? Что приводит к выбору неправильной тактики лечения? Есть три пути возможного развития: будут разработаны быстрые, дешевые и эффективные методы скринингового обследования на наличие антител, влияющих на результаты иммунологических анализов; можно будет проводить осаждение иммуноглобулинов с помощью ПЭГ (полиэтиленгликоля) еще до проведения анализа с тем, чтобы удалить антитела прежде, чем анализ будет выполнен; внедрение автоматических анализаторов нового поколения сделает профилактические манипуляции и центрифугирование проще. Исчезнет необходимость в длительном пошаговом проведении анализа.

В настоящее время основные усилия направлены на разработку методов, которые были бы более устойчивы к влиянию антител. Это не так просто, как кажется, поскольку антитела в значительной степени гетерогенны по механизмам воздействия и обладают различным сродством к антигенам, различной «авидностью», отличаются друг от друга по числу участков связывания даже в рамках одного анализа.

Между тем всегда будут существовать проблемы подготовки пациента и проблемы правильного обращения с материалом, которые не могут решать сотрудники лаборатории. Клиницисты должны знать, как время взятия материала и другие факторы отражаются на результатах анализов. По мере того как будет возрастать частота применения химического анализа, в частности газовой хроматографии и масс-спектрометрии, в лабораториях клиник, возможно, эти методы отчасти заменят иммунологические анализы. Между тем анализаторы этого вида являются дорогостоящими и более сложными в применении. Так, интерпретация хроматограмм или данных масс-спектрометрии сложнее, чем определение концентрации какого-либо вещества. Могут возникнуть более существенные проблемы, чем связанные с действием антител, например невозможность разделить при хроматографии некоторые лекарственные препараты с исследуемым веществом.

В настоящее время широко распространены пищевые добавки и препараты на лекарственной основе, которые также потенциально могут влиять на результаты исследования.

Создается впечатление, что проблема отклонения результатов иммунологических анализов будет сохраняться еще на протяжении долгого времени,

хотя лаборатории будут делать все возможное для выявления и устранения таких отклонений. Следует отметить, что в большинстве случаев именно от врача-клинициста и от его взаимодействия со специалистом по клинической биохимии зависит частота выявления отклонений в иммунологических исследованиях.