Стандартные препараты и эффекты матрикса

**ВВЕДЕНИЕ**

В этой работе обсуждается проблема приготовления стандартов и матрикса, а также их влияние на стандартизацию иммуноанализа. Стандартизация базируется на применении определенных принципов и обычно включает в себя оценку систематических ошибок, точности, воспроизводимости и сопоставимости данного метода с другими. Независимо от того, насколько усложнена или, наоборот, упрощена новая аналитическая система, при ее стандартизации должны соблюдаться одни и те же принципы. Непонимание этих принципов и пренебрежение ими приводят к серьезным ошибкам.

Таким образом, в данную работу включены следующие вопросы: 1) проблемы, связанные с так называемым матриксным эффектом; 2) другие факторы, иногда ошибочно приписываемые матриксыому эффекту; 3) последствия замены одного международного стандарта на другой; 4) ограничения при использовании моноклональных антител; 5) проблемы приготовления контрольных матриксов для гаптенов; 6) некоторые новые и разрабатываемые стандарты Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC).

Стандартизация иммуноанализа необходима для 1) улучшения точности диагноза и мониторинга заболеваний; 2) выбора общих критериев для диагноза заболеваний; 3) возможности прямого сравнения эффективности различных иммунодиагностических наборов.

Прежде чем перейти к обсуждению указанных вопросов, хотелось бы обратиться с просьбой к читателям прочесть данный раздел до конца, каким бы сухим и скучным он ни показался.

**ПРОБЛЕМА МАТРИКСА**

Различные способы сравнения свидетельствуют, что обычно разные методы иммуноанализа дают хорошо согласующиеся между собой результаты. Однако иногда результаты определения конкретного вещества с помощью данного метода выходят за разумные пределы. Например, два года назад в одной из стран применение нескольких готовых наборов постоянно приводило к существенно отличающимся результатам определения тиреотропного гормона (TSH) в плазме. Представители компаний, выпускающих эти наборы, решили, что расхождения в результатах анализа могли возникнуть из-за применения различных по составу растворов для разведения международного стандарта. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ)\* было предложено разработать метод изучения эффекта различных матриксов. Затем ВОЗ совместно с Международной организацией клинической химии (IFCC) провела специальный симпозиум по данной проблеме, на котором были предложены пути улучшения сопоставимости результатов различных методов иммуноанализа.

Калибровка иммунодиагностических наборов. Для калибровки любого набора для анализа каждая фирма, выпускающая такие наборы, имеет систему первичных и вторичных стандартов. Первичный контрольный стандарт обычно состоит из алик-вот, взятых из серии разбавлений стандарта. Каждая аликвота содержит известное количество определяемого вещества и хранится при очень низкой температуре. Эти аликвоты используются для калибровки рабочих стандартов, которые в свою очередь применяют для калибровки выпускаемых наборов. Определяемое вещество в первичном стандарте может быть или известным количеством чистого химического соединения, или полипептидом, содержание которого выражено в единицах международного биологического стандарта, или препаратом, калиброванным по данному пептиду. Для разбавления стандарта часто используют сыворотки, буферные растворы и растворы, содержащие белок-носитель. Состав этих растворов, или, как их еще называют, матриксов, может влиять на реакцию антиген - антитело, в результате чего и появляются систематические ошибки и непостоянство результатов анализа. Это явление называют "матриксным эффектом". Принцип сопоставимости анализов заключается в том, чтобы анализируемое вещество в пробе взаимодействовало в тех же условиях, что и в стандартном растворе. Молекулярное окружение определяемого вещества в обоих растворах должно быть идентичным или очень близким по составу; только тогда можно точно определить его концентрацию. Определение большинства веществ проводится в сыворотке, и, несомненно, матриксные эффекты связаны с типом и способом обработки материала, используемого для разбавления стандартов. Ясно, что такой матриксный эффект отличен от эффектов, обусловленных прис> гствием аутоантител, лекарственных препаратов, опухолевых клеток или необычно высоких концентраций предшественников или метаболитов определяемого вещества.

Матриксные эффекты чаще всего влияют на определение ти-реотропина (TSH), общего тироксина (Л4), общего трииодотиро-нина (Из), пролактина, фолликулостимулирующего гормона (FSH), лютеинизирующего гормона (LH) и стероидов (кортизола, прогестерона и тестостерона, если они предварительно не выделены из пробы экстракцией).

Другие возможные источники систематических ошибок. Другие связанные с проблемами стандартизации причины расхождений в результатах анализа могут быть обусловлены 1) различиями в молекулярной структуре определяемого вещества или веществ в пробе и стандартном растворе (по сути дела, в этом случае сравниваются разные соединения); 2) различиями в составе, способе хранения и стабильности стандартов, используемых фирмами-поставщиками в качестве первичного и рабочего стандартов, а также стандарта для наборов; 3) систематическими ошибками, связанными с различной специфичностью анализа на каждой стадии калибровки; 4) ошибками при технических операциях (например, при разбавлении растворов), а также неудачной оптимизации условий анализа, особенно при разделении свободного и связанного с антителами вещества.

Различия в молекулярной структуре чистых химических соединений могут быть обусловлены присутствием изомеров, связывание которых с белками плазмы может происходить иначе, чем у гаптенов, обладающих только нативной пространственной конфигурацией. В этом случае при приготовлении стандартов не помогает и добавление экзогенного стероида к сыворотке. Кроме того, отношение связанного с белком и свободного определяемого вещества может изменяться в зависимости от условий анализа, например рН или ионной силы. Наконец, небольшие различия в методах выделения определяемого вещества из физиологических жидкостей могут быть источниками разброса и систематической ошибки результатов анализа.

Молекулярная гетерогенность стандартов. ВОЗ установлены международные стандарты, контрольные препараты или контрольные реагенты для двух групп сложных биологических соединений: 1) соединений (например, пептидных гормонов), которые можно очистить и определить количественно с помощью биологических анализов; 2) веществ (например, ферритина или субъединиц гликопротеиновых гормонов), которые в настоящее время можно определить только по их иммунологической активности.

Международные стандарты для соединений первой группы обычно содержат препараты очищенного гормона и белок-носитель. Такой состав стандартов позволяет охарактеризовать их с помощью как определенных методов биоанализа in vivo или in vitro, так и физико-химических методов. Эти методы используются для идентификации и количественного определения таких веществ [1 ].

Другой причиной несоответствия между стандартами является природная гетерогенность молекулярной структуры, которая наиболее часто наблюдается в случае гликопротеиновых гормонов (TSH, FSH, LH), а также пролактина и гормона роста. Содержание изогормонов изменяется в зависимости от источника и способа получения.

Молекулярная структура определяемого вещества может изменяться при лиофилизации, которая почти всегда включается в методики приготовления международных и большинства вторичных стандартов. Такие изменения можно обнаружить и оценить количественно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и изоэлектрического фокусирования. Можно выделить два обычных типа денатурации: 1) необратимая деформация молекулы белка из-за пересушивания; 2) образование комплексов между пептидом и носителем, например лактозой, манни-том и трёгалозой.

И наконец, не менее важным фактором является собственная нестабильность определяемого вещества в стандарте. Причина, природа и степень изменений структуры многих сложных белков (дезаминирование, окисление, изменение конформации), которые происходят при их хранении, очень мало или совсем не изучены, а часто просто игнорируются.

В иммуноанализе стандарт обычно растворяют или разбавляют матриксом, аналогичным тому, в котором растворена проба, содержащая определяемое вещество.

Матриксы. Для различных определяемых веществ в качестве матриксов используют разнообразные материалы, причем их состав зависит от изготовителя. Наиболее часто используемые матриксы включают цельную сыворотку или плазму человека, содержащие определяемое вещество в физиологических или патологически низких концентрациях. Иногда матриксы получают из свежей крови, но гораздо чаще для этого используют препараты плазмы человека, которые уже непригодны для трансфузии. Кроме того, в качестве матриксов применяют сыворотки животных и препараты альбумина человека или животных.

Перед использованием матриксы, особенно сыворотки, должны быть проверены на патогены, например, на поверхностный антиген вируса гепатита, а также соответствующим образом обработаны с целью удаления или снижения до минимума содержания определяемого вещества. Для этих целей используют обработку антителами, активированным углем, силикагелем и ионообменными смолами. Некоторые из этих методов и реагентов дают плохо воспроизводимые результаты; например, различные партии активированного угля имеют различные адсорбционные характеристики. Большинство методов, разработанных для удаления Определяемого вещества из сыворотки в промышленном масштабе, хранится в секрете.

Стандартизация матриксных эффектов. Для улучшения сопоставимости результатов, полученных с помощью различных методов иммуноанализа, ВОЗ было предложено поставлять общий контрольный матрикс для использования с определенными международными стандартами. Такой матрикс мог бы выпускаться в виде ампул с лиофилизованной цельной сывороткой, обработанной соответствующим образом для удаления из нее определяемого вещества. Любой используемый для обработки метод должен точно воспроизводиться при получении последующих партий, а технологая всего процесса должна быть детально описана и опубликована. Ампулы с таким материалом, который подробно охарактеризован в независимых исследованиях и официально одобрен ВОЗ, затем поставлялись бы вместе с соответствующими стандартами.

Однако реализация такой программы предполагает выполнение громадного объема научной, организационной и практической работы и соответствующие расходы. Фактически затраты на введение международного стандарта при этом должны были бы удвоиться. Соответствующие предложения были распространены ВОЗ в 1985 г. для выяснения мнения ученых, фирм - производителей наборов и национальных органов контроля [2]. Спектр поступивших откликов был очень широк, начиная от полной поддержки идеи введения контрольного матрикса фирмами, выпускающими наборы, до прямо противоположной точки зрения, согласно которой все проблемы эффекта матрикса могут быть решены с помощью соответствующей оптимизации метода анализа.

Совместные исследования. В конце концов было решено поддержать идею проверки и получения экспериментальных доказательств того, насколько введение общего матрикса улучшило бы соответствие результатов анализов. Для этой цели была создана совместная рабочая группа ВОЗ и IFCC, в задачи которой входило выяснение влияния двух различных материалов, используемых в качестве матрикса при анализе TSH. Выбор этого гормона был обусловлен тем, что его определение должно быть как можно более точным и чувствительным для получения необходимой в клинической практике информации. Кроме того, препараты TSH гетерогенны, нестабильны и трудно поддаются стандартизации.

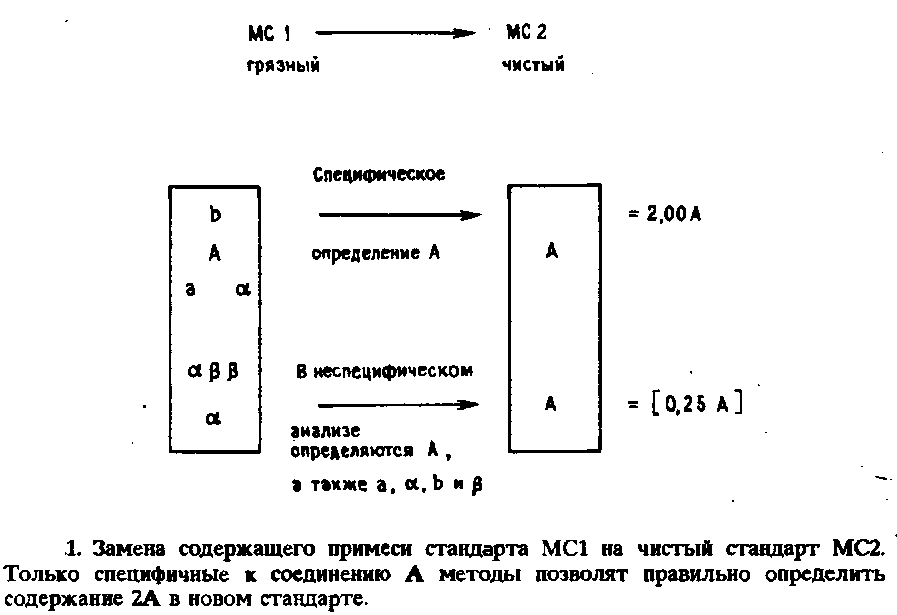
Получение сыворотки с низкими концентрациями TSH представляет собой сложную проблему, поскольку ее получают только от больных, страдающих определенными видами тиреоидной аденомы. В гораздо больших количествах такую сыворотку можно получить от здоровых людей, у которых их собственная тиреоидная функция была подавлена введением Тз в течение нескольких дней. Последние разработки предлагают еще более простой способ получения матрикса путем обработки уже непригодной для клинического применения плазмы из банка крови с помощью лектинов, которые адсорбируют эндогенный TSH. В настоящее время проводятся совместные эксперименты с первыми двумя типами сывороток. Полученные результаты и выводы будут представлены в Экспертный комитет ВОЗ по биологической стандартизации.

ВЛИЯНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ

Первые стандарты для научно-исследовательских работ. Сейчас ясно, что научно-исследовательские работы в области иммуноанализа развивались столь быстрыми темпами за счет введения общего стандартного материала на самых ранних этапах исследований. Благодаря этому лаборатории обеспечивались достаточно хорошими стандартными препаратами при разработке методов очистки и количественного определения. В 60-х гг. Отдел биологических стандартов Национального института медицинских исследований (NIMR) ввел научно-исследовательские стандарты для ряда веществ (кальцитонин свиньи, эритропоэтин, гипофизарные гормоны человека FSH, LH, TSH, GH, пролактин). Скоро стало очевидным, что сопоставление качественных и количественных данных сильно облегчается, если для сравнения использован один и тот же стандартный препарат. Впоследствии некоторые из научно-исследовательских стандартов NIMR были приняты Экспертным комитетом ВОЗ по биологическим стандартам в качестве международных. Кроме того, система единиц, используемая в научно-исследовательских стандартах, была принята за основу при разработке применяемых сейчас международных единиц.

Выбор подходящего материала. Одной из первых проблем при введении научно-исследовательских стандартов стал выбор соответствующего материала. На ранних этапах исследования молекулярная структура вещества часто вообще или почти неизвестна. В этом случае обычно используют тот доступный материал, который в рамках имеющейся о нем информации считается наиболее подходящим. Очень часто приходится использовать грубый неочищенный экстракт или даже необработанные и нефракци-онированные физиологические жидкости, например сыворотки. В случае ряда веществ, например гормонов, которые идентифицируют на первых стадиях исследования по их биологической активности, исходный материал, используемый для приготовления стандарта, обычно представляет собой концентрированный экстракт, пригодный для характеристики гормона и применения в биоанализах in vivo. Если же неизвестна подходящая биологическая функция, пригодная для контроля определяемых веществ (таковы, например, неактивные предшественники или метаболиты), то наиболее разумным будет использование индивидуальной или смешанной сыворотки.

Замена некорректных стандартов. Внедрение научно-исследовательских стандартов может сопровождаться рядом затруднений. Данный материал может оказаться непригодным для стандарта чаще всего в силу того, что он содержит или определяемое вещество в денатурированном виде, или его предшественники и метаболиты, или другие вещества, достаточно близкие по молекулярной структуре, в таких количествах, которые могут помешать протеканию иммунологической реакции. Если такие факты точно установлены, необходимо заменить "неподходящий" стандарт на другой, состоящий по возможности из наиболее чистого препарата, имеющегося в распоряжении. Следует подчеркнуть, что стандарт является только "рабочей гипотезой материала". Это всего лишь препарат, который, по имеющимся в настоящее время сведениям, можно использовать для корректного количественного определения данного вещества. В любой момент в свете новых научных данных этот стандарт может оказаться неподходящим



Замена "грязных" стандартов. Очень часто не понимают значения и причин замены одного стандарта на другой, более высокой степени чистоты. Если меняется международный стандарт, то последствия непонимания причин такой замены могут проникнуть в национальное законодательство, промышленность и клиническую практику. Поэтому очень важно ясно представлять себе, почему заменен данный стандарт и что в этом случае следует делать.

~ Рассмотрим первый стандарт, в данном количестве которого (массе, содержимом ампулы) содержится х молекул вещества А и некоторое количество молекул, сходных по ряду свойств (например, иммунореактивности) с веществом А. Этот стандарт заменяют на другой, содержащий удвоенное количество 2х (на мг или на ампулу) чистого вещества А. Когда второй стандарт анализируют с помощью метода, специфичного к А (т.е. когда определяется только А), то результаты анализа должны Показать удвоенное содержание А во втором стандарте по отношению к первому стандарту. Если же второй стандарт анализируют с помощью метода, в котором взаимодействуют и примеси, подобные А, и находящиеся в первом стандарте, то количество вещества А во втором стандарте по данным этого анализа будет меньше Ъс. Степень занижения результатов зависит от специфичности данного анализа. Эта проблема описана в работе [3] и проиллюстрирована на рис. 2.1. Как отмечал профессор Финяи, важна не столько математика биологической стандартизации, сколько понимание лежащих в ее основе принципов.

Последствия внедрения международного стандартного препарата (МСП) для определения хорионического гона-дотропина человека. Ярким примером того, какие недоразумения могут возникнуть при замене "грязного" международного стандарта на другой, содержащий более чистый материал, является ситуация, возникшая в ходе внедрения второго международного стандарта (МО хорионического гонадотропина человека (hCG) для калибровки международного стандартного препарата (МСП), предназначенного для иммуноанализа hCG. Определение hCG в сыворотке крови или в моче используют для диагностики ранних стадий беременности. Естественно, чем более чувствителен тест, тем ранее он даст положительный сигнал. При перекалибровке различных продажных наборов по новому МСП в тех наборах, в которых происходило неспецифическое взаимодействие с многочисленными примесями, содержащимися во 2-м МС (а- и /5- субъединицы, денатурированные формы hCG), пришлось менять градуировку стандартов, входящих в-наборы. В результате такой замены ухудшилась истинная чувствительность определения почти всех наборов. Последствия оказались весьма неприятными, поскольку пришлось давать объяснения медикам и потребителям наборов. Такие объяснения были опубликованы [4, 5]. Корректность нового МСП была подтверждена с помощью специфических моноклональных антител [6]. Этот пример не является единственным. Подобная ситуация может возникнуть сейчас после введения в 1986 г. нового международного стандарта для FSH; перекалибровка соответствующих иммуноаналитических наборов (в некоторых случаях в 5 раз), по-видимому, встретится с теми же трудностями, что и в случае hCG.

Первый международный стандарт для гипофизар-ного FSH. Ввиду важности определения гипофизарного и сывороточного FSH первый международный стандарт и второй МСП были введены именно для этих гормонов (МСП также для LH). Эти МСП были приготовлены профессором Рейчертом в лаборатории профессора Вильгельми путем экстракции гипофизов, хранившихся в ацетоне. Оригинальный исходный материал известен в Америке под шифром LER 907. Часть этого материала была лиофилизо-вана в ампулах (код 69/104) в Отделе биологических стандартов NIMR и в дальнейшем была использована в качестве научно-исследовательского стандарта. Полученный препарат был принят ВОЗ в 1.973 г. в качестве МСП для биоанализа гипофизарных FSH и LH [7 ]. Когда первая серия ампул (около 3500 штук) была израсходована, в качестве второго МСП для биоанализа FSH и LH стали использовать новую серию (код 78/549), также полученную из LER 907. Хотя различные аликвоты одного и того же материала были обработаны аналогичным образом [8], нельзя утверждать, что по составу LER 907, 69/104 и 78/549 идентичны, поскольку неизвестно, какие молекулярные изменения произошли в образцах в процессе хранения и лиофилизации.

Начиная с 1973 г. были проведены многочисленные исследования по изучению свойств гипофизарного FSH и введению чистого стандарта. Эта работа была проделана профессором Е.Дизфалу-си, Д.Робертсоном и А.Завди в Каролинском институте в Стокгольме и профессором П.Сторрингом в Отделе эндокринологии Национального института биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) в Лондоне. С помощью элегантных и детальных экспериментов были обнаружены изогормоны, сильно различающиеся по своей биологической активности [9, 10]. Несмотря на гетерогенность гормона, было принято решение в качестве нового стандарта использовать смесь этих гликопротеидов. В соответствии с правилами Экспертного комитета ВОЗ по биологической стандартизации в качестве стандарта был выбран экстракт, обладающий самой высокой фол-ликулостимулирующей активностью in vivo. Соответствующий тест основан на определении увеличения массы яичников в группе неполовозрелых крыс, получавших определенные дозы FSH и избыток LH в течение 4-5 дней.

Был выбран и лиофилизован в ампулах лучший образец. После предварительной проверки новый стандарт был калиброван против МСП для биоанализа гипофизарных FSH и LH 27 группами ученых в 13 странах. Эксперименты включали также использование ряда других калиброванных материалов, в том числе и соответствующих сывороток.

2.3.7. Введение единицы международного стандарта FSH. Эксперименты по стандартизации нового препарата гипофизарного FSH были спланированы и выполнены д-ром Сторрингом и д-ром Дас. Полученные результаты, которые позднее будут опубликованы полностью, можно отнести к одной из трех групп: 1) около 80 м.ед. FSH на ампулу при биоанализе in vivo; 2) около 30 м.ед. FSH на ампулу при биоанализе in vitro и в рецепторном тесте; 3) около 16 м.ед. FSH на ампулу по данным различных видов им-муноанализа.

Какой же тип анализа должен быть взят за основу для введения нового стандарта? Согласно рекомендациям ВОЗ, это должен быть биоанализ in vivo, поскольку это единственная известная система, в которой сиалилированные и гликозилированные изогормоны FSH, а также их метаболиты оцениваются по физиологическому эффекту на интактные клетки in situ. С другой стороны, можно утверждать, что биоанализ in vitro и рецепторный тест позволяют определить количество активного гормона точнее, однако полученные результаты сильно зависят от качества изолированных тканей, клеток и рецепторов, которые в процессе обработки могут модифицироваться, например, ферментами. Кроме того, данные методы не отражают естественные межклеточные взаимодействия и слишком непродолжительны по времени, чтобы зафиксировать другие медленнр проявляющиеся эффекты активности FSH. Более низкие результаты иммуноанализа можно объяснить перекрестными реакциями антител с другими гликопротеинами и примесями, содержащимися в МСП гипофизарных FSH и LH.

Следует помнить, что биоанализ гормонов in vivo широко используется и хорошо описан в научной литературе и руководствах по фармакологии. Одни и те же линии крыс и мышей имеются во многих лабораториях мира, поэтому наблюда£й<г\*,реакция связана только с биологической активностью гормона. В случае же иммуноанализа используемые реагенты сильно различаются по составу. и имеют ограниченное время жизни. Характеристики каждой системы анализа редко бывают детально документированы, и наблюдаемые колебания результатов' (например, доля связанной метки), как правило, не связаны с биологической активностью гормона.

Поскольку новый стандарт должен представлять активный FSH, то величина 80 м.ед. на ампулу кажется наиболее обоснованной. Большинство участников международных испытаний согласились с этим выводом, и позднее Экспертный комитет ВОЗ по биологическим стандартам утвердил материал с кодом 83/575 в качестве третьего международного стандарта FSH с содержанием 80 м.ед. на ампулу.

2.3.8. Последствия введения нового МС. Решение принять величину 80 м.ед. FSH на ампулу в качестве третьего междуна-/ родного стандарта имеет далеко идущие последствия как для фирм, выпускающих соответствующие наборы, так и для клиницистов. Первым придется перекалибровать их собственные стандарты и наборы, а также переоценить специфичность анализа. В клинической химии необходимо провести большую учебную и разъяснительную работу. Например, величина отношения LH/FSH, часто использующаяся при диагнозе поликистоза яичника, после введения нового стандарта изменится. Ясно, что введение нового МС потребует много времени. В переходный период было предложено использовать оба стандарта, однако производителям и потребителям наборов и редакторам периодических научных журналов рекомендовалось указывать, какой стандарт в каждом случае использовали при определении FSrf. Такой подход был принят после введения очищенного МСП для hCG, и можно надеяться, что он сгладит неудобства переходного периода как для поставщиков, так и для клиницистов.

После принятия более чистого стандарта для FSH должны быть введены и стандарты для субъединиц или подобных FSH веществ, если будет доказано, что их определение представляет практический интерес. При необходимости будут введены международные стандарты и для изолированных а- и /3-субъединиц FSH.

В этой работе процедуре замены международных стандартов было уделено много внимания, поскольку, по мнению автора, очень часто замена стандартов вызывает недоразумения только потому, что не поняты важность и сущность этого процесса.

**ТЕХНОЛОГИЯ РЕХОМБИНАНТНЫХ** ДНК

В последние годы для крупномасштабного получения труднодоступных пептидов все более широкое распространение получают методы генной инженерии (технологии рекомбинантных ДНК). Некоторые из белков (инсулин, гормон роста), полученных этим методом, абсолютно идентичны природным белкам человека. Другие вещества, например гликопротеин эритропоэтин, идентичны нативным веществам по структуре полипептидной цепи, но немного отличаются от них по строению боковых углеводных цепей в зависимости от продуцирующей линии животных клеток. Получение белков и некоторых гликопротеинов в качестве стандартов генно-инженерным путем наиболее удобно в случае труднодоступных объектов (интерлейкины la и /?, ренин, интерфероны человека). Проблемы контроля производства и детального исследования свойств рекомбинантных продуктов рассмотрены в работах [П, 12].

**ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

Применение моноклональных антител для йммуноанализа пептидов требует большой осторожности, поскольку высокоспецифичные моноклональные антитела могут взаимодействовать, например, только с одним из изогормонов. По этим же причинам нельзя использовать "слишком" специфичные моноклональные антитела и для аффинной очистки пептидов. Кроме того, существует опасность разрушения образца при его элюировании с аффинной колонки под действием рН и ионной силы раствора. И наконец, следовые количества антител могут загрязнять очищенный продукт и влиять на результаты анализа.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ГАПТЕНОВ**

Высокоочищенные стандартные препараты гаптенов можно получить от производящих их фирм и из некоторых некоммерческих источников, например из коллекции стандартов стероидов Медицинского научно-исследовательского центра. Многие гаптены (например, определенные гормоны и лекарства) довольно плохо и с различной аффинностью связываются с белками крови, поэтому частично (обычно < 5%) они находятся в свободном виде. Ранее иммуноанализу многих гаптенов предшествовало их выделение экстракцией. В последнее время интенсивно разрабатываются методы определения суммарного количества определенного гаптена в сыворотке или плазме без его выделения. Кроме того; разработан прямой разделительный метод для определения не связанного С белками свободного гаптена (например, свободного Т4) в сыворотке. Эти Разработки включают создание и калибровку соответствующих матриксов, состав которых является коммерческим секретом. По-видимому, получение идеального матрикса, пригодного для решения любой физиологической или патологической задачи, является недостижимой целью.