

Két antigént felismerő immunszérum előállítása és vizsgálata a rejtett bélvérzés immunkémiai kimutatásához

Sz. Németh Mária, Ottó Szabolcs

Országos Onkológiai Intézet, Klinikai Laboratóriumi Osztály, Budapest

Cél: A szerzők a széklet-hemoglobin és -albumin egyidejű kimutatására dolgoztak ki immunkémiai eljárást és immunizálási módszert, a vastag- és végbélrákok szűrési eredményességének növelése érdekében. **Módszerek:** A humán-specifikus vérkimutatás során két antigént felismerő bispecifikus immunszérumot termeltek kecskékben, glutárdialdehid segítségével létrehozott hemoglobin-albumin-komplex beoltása révén. A tisztított, kettős antitesttartalmú immunszérumot 1196 főből álló, 40 éves kor feletti szűrési csoportnál próbálták ki, Fecatest kazeták felhasználásával. **Eredmények és következtetések:** Az immunszérum analitikai érzékenysége – mindkét fehérjére – 0,5 µg/ml-nek bizonyult, amely a szűrés szempontjából igen kedvező. Továbbá, az immunkémiai reakciók intenzitása fokozódott, amely növelte a kimutatás biztonságát, a specificitás csökkenése nélkül. Mivel az időegység alatt elvégezhető immunkémiai vizsgálatok száma (többletköltség nélkül) megkétszereződött, a módszer költségkímélő módon növelte a szűrés hatékonyságát. *Magyar Onkológia 48:45–47, 2004*

Objectives: The authors have developed an immunochemical procedure and an immunisation method for the simultaneous detection of fecal hemoglobin and albumin to increase the screening effectiveness of colorectal cancers. **Methods:** In the human specific blood testing, bispecific immunoserum recognising two antigens have been produced by glutardyaldehyde-hemoglobin-albumin makromolecule immunisation of goats. The purified and concentrated antiserum with double antibody specificity has been checked in a screening group of 1196 individuals aged over 40 years with Fecatest reservoirs. **Results and Conclusions:** The analytical sensitivity was proved 0.5 µg/ml for both proteins, which was greatly favourable for the screening. Furthermore, the intensity of the immunochemical reactions has grown, and it has increased the safety of the detection without decreasing the specificity. Because the number of the immunochemical tests that could be completed at the same time has been doubled (without excess of cost), this method has increased the effectiveness of the screening with taking care of expense. *S Németh M, Ottó S. Production and examination of double antigen specific immunoserum for immunochemical detection of occult blood. Hungarian Oncology 48:45–47, 2004*



Bevezetés

A korán felismert vastag- és végbélrákok, valamint a rákelőző állapotot jelentő polypok eredményes felkutatásánál kiemelt szerepet játszik a rejtett bélvérzés érzékeny módszerekkel történő kimutatása (3–5, 8, 15).

Szűrési adatok és biztosan daganatos betegek előzetes vizsgálata szerint a széklet hemoglobin-

és albumin-tartalmának párhuzamos vizsgálata optimális eredményt biztosíthat (10, 13). Legutóbbi, világbanki támogatással megvalósult, modell értékű vastag- és végbélrákszűrésünk összeített eredménye alapján, a széklet-hemoglobin és -albumin párhuzamos kimutatásával felismert rosszindulatú elváltozások számát duplájára növelhettük (6 helyett 12 eset), a polypok számát pedig közel másfélszeresre emeltük (41 helyett 59 felfedezett elváltozás) (1).

A székletminták albumintartalma emelkedett lehet bizonyos egyéb, tünetekkel járó bélbetegségekben is, de a plusz klinikai vizsgálatokat ellensúlyozza, hogy a szűrés hatékonyságának, a korai állapotban felismert és még eredményesen gyó-

Közlésre érkezett: 2003. május 26.

Elfogadva: 2003. augusztus 1.

Levelezési cím: Dr. Ottó Szabolcs, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.

Telefon: 224-8688, Fax: 224-8699, e-mail: sz.otto@oncol.hu

gyítható daganatok számának jelentős növekedését érhetjük el a széklet-albumin egyidejű vizsgálatával (11, 12).

Felmerült a kérdés, hogy megoldható-e egy lépésben, ugyanazon mintából egyszerre meghatározni e két vérfelhérjét. Immunkémiai keresztreakciók lehetősége miatt nem jöhetett szóba az eddig használt anti-human hemoglobin és anti-human albumin antiszérumok egyszerű keverése.

Olyan, kettős antigénfelismerő immunszérum előállítás és kipróbálása mellett döntöttünk, amely érzékenyen képes felismerni az emberi hemoglobint és albumint egyaránt.

Ismert tény, hogy az albuminmolekula antigenitása kiváló, erős immunválaszt indukál. Feltehető volt, hogy egy antigénkeverékkel történő állatimmunizálás során az albuminra adott immunreakció „elnyomja” a hemoglobinra adott választ.

Ezt elkerülendő, az antigénkeverékből glutárdialdehyd segítségével létrehozott makromolekula-kompleksszel immunizáltunk kecskéket. A tisztított immunszérumok használhatóságát a szűrési gyakorlatban, összehasonlító vizsgálatokkal ellenőriztük.

Anyag és módszer

Két antigént felismerő immunszérum előállítása

Az oltóanyag 4 térfogatrész tisztított humán hemoglobinoldatot (2 mg/ml) és 1 térfogatrész tisztított humán albuminoldatot (2 mg/ml) tartalmazott.

Az oltás előtt 30 perccel a fenti oltóanyagkeverékhez milliliterenként 0,1 ml 0,25%-os, frissen készített (25%-os törzsoldatból hígított) glutárdialdehydet adtunk. Alapos keverés után az elegyet szobahőmérsékleten állni hagytuk a fehérjekomplex kialakulása céljából. Utána 5 ml-t azonos mennyiségű Freund-adjuvánnal (komplett típusú) emulgeáltunk. Kb. 45 kg-os kecskéket oltottunk a fenti emulzióval intracutan, a test két

oldalán, oltásonként 0,5 mg antigénnel. Kétféleképpen ismételt oltásokat adtunk, az ellenanyag titerét folyamatosan figyeltük. 5–6 oltás után (titer legalább 1:512) az állatot elvéreztettük.

Az immunszérum tisztítása

800 ml szérumhoz állandó keverés mellett 200 g kristályos ammóniumsulfátot adtunk szobahőmérsékleten. A kicsapott immunszérumot 24 óráig állni hagytuk, majd centrifugáltuk 4000 fordulat/perc mellett 30 percig. A csapadékot 400 ml desztillált vízzel oldottuk fel, és megismételtük a fenti kicsapási eljárást 100 g ammóniumsulfáttal. A második kicsapás után nyert csapadékot dializáló hüvelybe töltöttük, és 2x2 órán át dializáltuk desztillált vízzel szemben szobahőmérsékleten. Ezután egy héten át folytattuk a dialízist 0,05 M nátriumacetát puffer (pH=5,0) ellen, 3 váltással, +4 fokon. Végül a csapadékos folyadékot centrifugáltuk 4000 fordulat/perc mellett 60 percig. Utána a felülúszót DEAE-Sephadex ioncserélő oszlopon engedték át, majd az összegyűlt fehérjefrakciót kisózással koncentráltuk. A végső dialízis 0,15 M veronapuffer (pH=8,6) ellenében történt.

Az antiszérum ellenőrző vizsgálata

Az analitikai specificitás- és érzékenységi vizsgálatok agaróz-zónaelektroforézissel, immunoelektroforézissel és elektroszínerezissel történtek. A két antigénnel, valamint teljes humán vérrel végeztük a vizsgálatokat, a referencia antiszérumok DAKO gyártmányú termékek voltak.

Az előzetes kipróbálás

1196 fős, panasz- és tünetmentes, 40 éves életkor fölötti lakossági csoportnál történt. A jelenlegi szűrési modell szerint (Fecatest vizsgálat 3 egymást követő napi székletmintából) elvégeztük az immunkémiai vérkimutatást, kiegészítve az antiszérumokat az új, bispecifikus immunreagenssel.

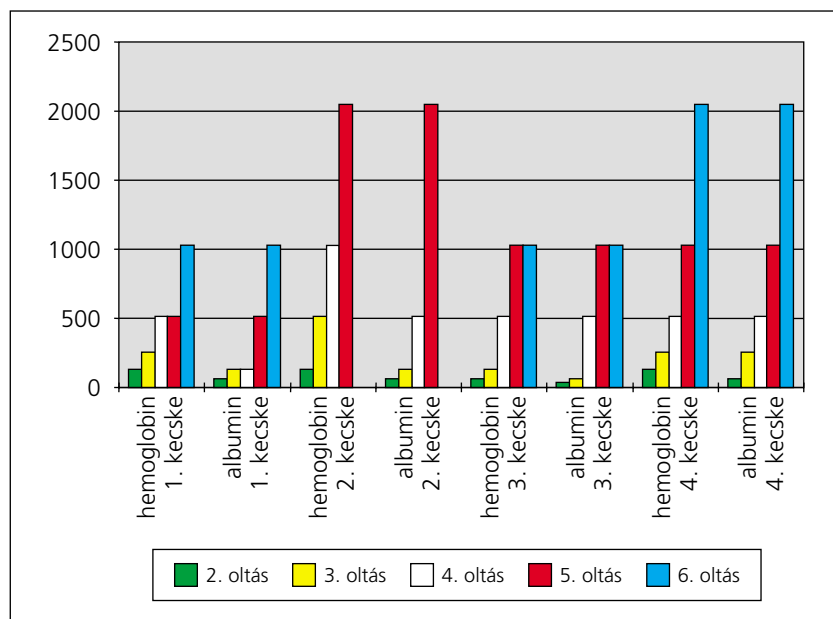
Eredmények

Az immunizálás eredménye

2001-2002 során nagy mennyiségű két antigént felismerő antiszérumot állítottunk elő, több lépésben. A DAKO gyártmányú referenciaszérumokkal megegyező specificitású, kecskeszérumból nyert tisztított keverék analitikai érzékenysége hemoglobinra és albuminra is 0,5 µg/ml-nek bizonyult. Tapasztalataink azt mutatják, hogy az állatok oltásához használt fehérjekomplex egy újfajta szignált képviselt. Az immunreakció dinamikája a várttal ellentétesen alakult.

Először a hemoglobinra adott immunválasz volt erősebb, és időben eltolódva a későbbiek során erősödött meg az albumin jele (1. ábra). Az elvéreztetés időpontjában már közel egyforma erős és egyaránt érzékeny precipitációs reakciót tapasztaltunk a két antigénre.

1. ábra.
Az ellenanyag-titerek
változása



A szűrési csoport eredménye

1196 személytől összesen 3410 székletminta immunkémiai vizsgálatát végeztük el. Hemoglobinpozitivitást 77 személy 138 mintájánál (59,74%) találtunk, albuminnal 136 személy 249 székletmintája (61,03%) mutatott pozitív reakciót. A bispecifikus antiszérummal 136 személy 264 mintája (64,70%) bizonyult pozitívnak (2. ábra).

A vizsgált személyek közül 43%-nak egyetlen mintája, 35%-nak 2 székletmintája, míg 22%-nak mindhárom mintája volt hemoglobin-pozitív.

A pozitív személyek 42%-a esetén a három székletből csak 1 volt albumin-pozitív, 33%-nál 2 minta, 25%-nál pedig mind a három székletminta.

A bispecifikus antiszérummal a pozitív személyek száma változatlan maradt, bár közel azonos számmal (7 illetve 8) nőtt a két, illetve a három pozitív mintát mutató személyek aránya.

Megbeszélés

Korábbi munkáink során már eredménnyel alkalmaztunk glutárdialdehydet fehérjék összekapcsolására, valamint immunkémiai reakciók érzékenységének növelésére (2, 6, 7, 9).

A két antigént felismerő immunszérum előállításához használt oltóanyagkomplex makromolekulájába sikeresen épült be a hemoglobin. Az oltóanyagkeverékben nagyobb részarányban biztosítottunk hemoglobint, így a fehérjekomplex térszerkezete feltételezhetően több „receptor” kialakulását tette lehetővé erre az antigénre, ez magyarázhatja a hemoglobinra tapasztalt erős immunválaszt.

Az állatoltások során sikerült elkerülni az albumin domináns reakcióját, így mindkét antigénre érzékenyen reagáló antiszérumokat tudunk létrehozni, reprodukálható módon.

Előzetes kísérleti eredményeink szerint a tisztított bispecifikus antiszérum-keverék szűrésre alkalmas. Érzékenysége megfelelő, a felismert pozitív esetek száma nem változott a jelenlegi szűrési modell eredményeinek tükrében.

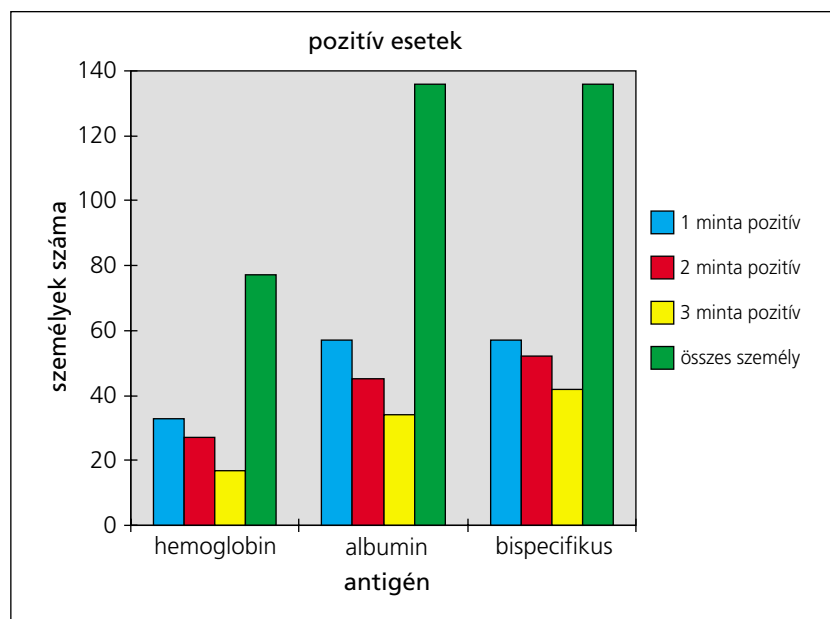
A rejtett bélvérzés immunkémiai kimutatásán alapuló egyéb vastag- és végbélrákszűrési módszerekkel összehasonlítva (14, 16-18) olcsó, és egyszerűen kivitelezhető.

Alkalmazásával megkétszerezhető az időegység alatt elvégzett immunkémiai vizsgálatok száma. Használatával plusz anyagköltség nélkül, költségkímélő módon, jelentősen növelhető a szűrés hatékonysága.

Irodalom

- Grépl A, Ottó Sz, Vámosi Nagy I. Colorectalis carcinoma szűrés adatai Budapest XI. kerületében 1997-1998-ban, különös tekintettel a költségekre. Budapesti Közegészségügy 32:217-218, 2000
- Lou K, Bowers J. Electroimmunoquantitation of serum proteins cross-linked by glutaraldehyde. J Immunol Meth 9: 67-79, 1975
- Mandel JS, Church TR, Bond JH, et al. The effect of fecal occult blood screening on the incidence of colorectal cancer. N Engl J Med 343:1603-1607, 2000

2. ábra. Immunkémiai székletvizsgálat eredménye



- Mulcahy HE, Farthing MJG, O' Donoghue DP. Screening for asymptomatic colorectal cancer. B M J 304:285-291, 1997
- Nakama H, Zhang B, Zhang X. Evaluation of the optimum cut-off point in immunochemical occult blood testing in screening for colorectal cancer. Eur J Cancer 37:398-401, 2001
- Ottó Sz. Determination of immunoglobulin subclasses by electrosinensis. Immunol Lett 4:229-230, 1982
- Ottó Sz. Simple screening of Bence Jones proteins from unconcentrated urine. Immunol Lett 6:209-211, 1983
- Ottó Sz, Kocsis Gy, Végh Zs, et al. Immunkémiai módszer a rejtett bélvérzések kimutatására, a módszer alkalmazása kétfázisú szűrővizsgálati rendszerben. Magyar Onkológia 31:187-193, 1987
- Ottó Sz, Sz. Németh M, Kocsis Gy, et al. Sensitized immunochemical method for the specific detection of human hemoglobin in dried biological samples. J Clin Lab Anal 5:373-377, 1991
- Ottó Sz, Németh M. Double immunochemical screening test (hemoglobin and albumin) for the detection of occult intestinal bleeding. J Clin Lab Anal 7:301-306, 1993
- Ottó Sz. A vastag- és végbélrák szűrése: a rejtett bélvérzés kimutatásának új stratégiája. Magyar Onkológia 45:3-7, 2001
- Ottó Sz. A rejtett bélvérzés kimutatásának új szempontjai a vastag- és végbélrákok szűrésében. Orvosi Hetilap 142:1541-1545, 2001
- Ottó S, Németh M. Screening for colorectal cancer with an immunochemical fecal occult blood test: 2 year follow-up. Br J Surg 83:11480, 1996
- Petrelli N, Michalek AM, Freedman A, et al. Immunochemical versus guaiac occult blood tests results of a community-based screening program. Surg Oncol 3:27-36, 1994
- Ron IG, Dale A, Tirosh R, et al. The potential of new screening test for colorectal cancer to enhance patient acceptability. J Tumor Marker Oncol 13:27-32, 1998
- Saito H. Cancer screening for colorectal cancer by immunochemical fecal occult blood testing. Jpn Res 87:1011-1024, 1996
- Van Dam J, Bond JH, Sivak MV. Fecal occult blood screening for colorectal cancer. Arch Intern Med 155:2389-2402, 1995
- Yoshinaga M, Motomura S, Takeda H, et al. Evaluation of the sensitivity of an immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. Am J Gastroenterol 90:1076-1079, 1995