

ELISA

– til detektion af A-substans

Denne artikel er en videreformidling af bachelor-projektet "Udvikling af ELISA til detektion af A-substans i plasma". Bachelorprojektet blev til i samarbejde med Klinisk Immunologisk Afdeling, Herlev Hospital. Den praktiske del af projektet er udformet på baggrund af artiklen "Soluble type A substance in fresh-frozen plasma as function of ABO and Secretor genotypes and Lewis phenotype" af F. J. Achermann et al. Analysen blev udført som et enzym-linket immuno assay (ELISA), en kvantitativ indirekte, non-kompetitiv sandwichmetode.

Der forekom uspecifikke bindinger mellem de benyttede antistoffer, signifikant forskel mellem de udførte dobbeltbestemmelser m.m. Det lykkes ikke at udvikle et færdigt assay til detektion af A-substans i plasma.

Blodtypeserologi

Blodtypen defineres af de tilstedeværende antigener på recipientens erythrocytter. Ved akutte blodtransfusioner, hvor recipientens blodtype er ukendt, transfunderes universale blodpakker (akutpakker) bestående af (5 SAGM af blodtypen O RhD neg, 5 friskfrosset plasma, FFP/1 kryopræcipitatpool og 2 trombocyt koncentrat (TK)). Dette er yderst vigtigt, for hvis recipienten modtager uforligeligt blod, vil erythrocytterne agglutinere.

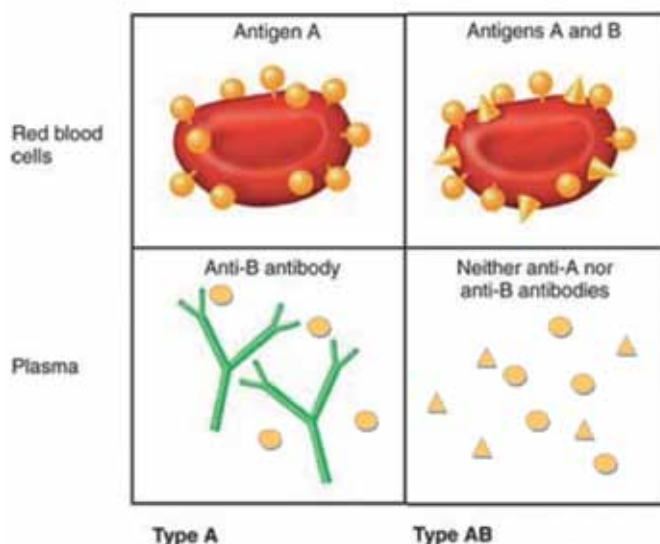
I ABO-blodtypesystemet forekommer tre forskellige typer af antigener, som varierer, alt efter hvilket kulhydrat der sidder på den sidste plads på kulhydratkæden, som danner antigenet. Der forekommer henholdsvis A-, B- og H-antigener. ABO-antigenerne er repræsenteret på alle kroppens celler og i opløselig form som A-, B-, eller H-substans i plasma. Der tages på nuværende tidspunkt ikke højde for forekomsten af substans i plasma ved blodtransfusioner.

Grundet mangel på "universalplasma" til akut blødende pa-

tienter hos blodbankerne består akutpakkerne i dag af A-plasma ved mangel på AB-plasma. Dette bachelorprojekt kunne således være med til at afklare, om anvendelsen af A-plasma i forhold til AB-plasma med hensyn til indhold af A-substans ville være et ligeværdigt produkt. Derudover har projektet relevans i forbindelse med organtransplantation. Ved organtransplantation skal donor og patients ABO-blodtype være i overensstemmelse (forligeligt), for at organet ikke afstødes.

Som følge af stor mangel på organer som nyrer, hjerter og lunger har man i klinikken et ønske om også at kunne anvende donororganer med uforligelige blodtyper. Dette kan gøres ved at fjerne de antistoffer i patientens blod, som ellers ville føre til afstødning af organet. En del af behandlingen kan være plasmaudskiftning med plasma af donortype, og her er hypotesen, at en vigtig faktor kunne være mængden af såkaldt A-substans, som ligeledes vil fjerne antistofferne i patientens blod.

I denne forbindelse er et ELISA-assay til detektion af A-substans i plasma et yderst vigtigt og relevant værktøj til hjælp for klinikerne.



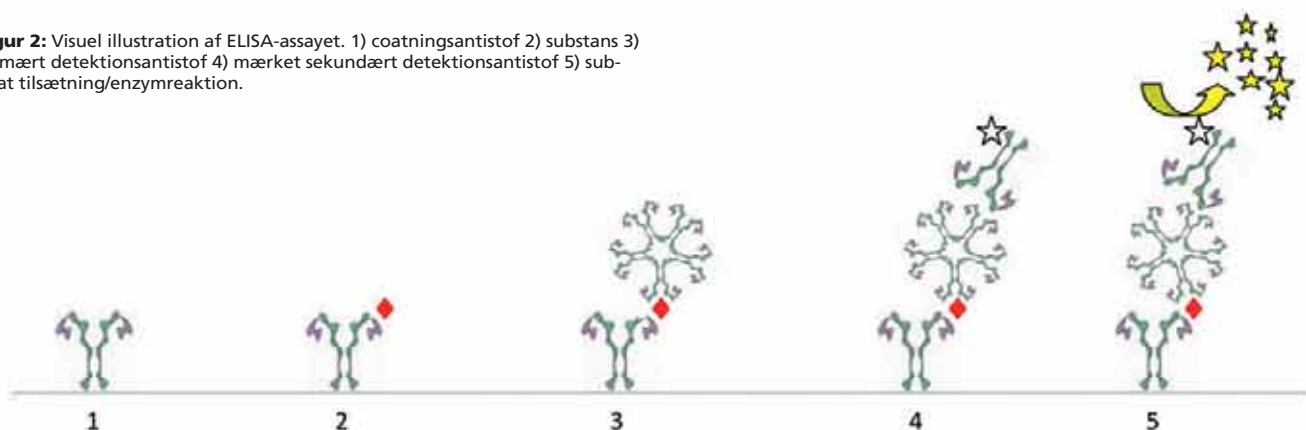
Figur 1: Illustration af forekomsten af antigener, antistoffer og substans i henholdsvis blodtype A og AB.



Julia Sander // bioanalytiker
Steno Diabetes Center
JLSD@steno.dk

Vejledere: Henriette Lorenzen, Professionshøjskolen Metropol, og Franziska Larsen, Klinisk Immunologisk afdeling, Herlev

Figur 2: Visuel illustration af ELISA-assayet. 1) coatningsantistof 2) substans 3) primært detektionsantistof 4) mærket sekundært detektionsantistof 5) substrat tilsætning/enzymreaktion.



Analyseprincippet kan opdeles i fem reaktionstrin, som ses på figur 2.

1. Mikrotiterpladen coates med BRIC145, hvilket er rettet mod A-substans i plasma. Mikrotiterpladen inkuberes natten over, og overskydende antistoffer vaskes væk i efterfølgende vaskeprogram.
2. Efter vask tilsættes substans i form af prøvematerialet. Mikrotiterpladerne inkuberes, og antigen/antistofkomplekset dannes.
3. I tredje trin tilsættes det primære detektionsantistof Seraclone anti-A, som bindes specifikt til det bundne A-substans i brøndene, Seraclone anti-A tilsættes i overskydende mængde, således at alt bundet A-substans bliver mættet med Seraclone anti-A. Overskydende Seraclone anti-A skylles væk via vask.
4. I det fjerde lag tilsættes det mærkede sekundære detektionsantistof Anti-IgM-Alkaline Phosphatase (AP), som er rettet mod FC-delen på det primære detektionsantistof Seraclone anti-A og inkuberes, hvorefter der vaskes.
5. Phosphatase-substrat tilsættes, og der forekommer en enzymreaktion mellem det enzymmærkede anti-IgM-AP-antistof og phosphatase-substratet. Reaktionen forløber i 30 min. inden aflæsning.

Der fremkommer en farverektion, hvor udviklingen af farveintensiteten er et mål for mængden af det bundne A-substans, dette måles fotometrisk ved 405-495 nm. via en ELISA-reader til tiden 30 min. og opgives i Optical density (OD-værdier).

Materiale og metode

Forsøget er udført på henholdsvis A- og AB-plasma fra donorer, som efterfølgende blev fænotypebestemt med henblik på A1 eller A1 \div blodlegemer på Rigshospitalet. De anvendte antistoffer er: coatningsantistof BRIC145 (IgG), primært antistof Seraclone anti-A (IgM) og sekundært antistof anti-Mouse-IgM (IgG). Samt vaskebuffer PBS/0,05%Tween20 og blokeringsbuffer PBS/1%BSA.

Detektionen af A-substans blev analyseret som en indirekte non-kompetitiv sandwichmetode til kvantitativ bestemmelse af A-substans.

Der blev udført 8 forskellige assays, hvor variationer som antistofkoncentration, inkubationstid og temperatur m.m. varierede.

Resultater og diskussion

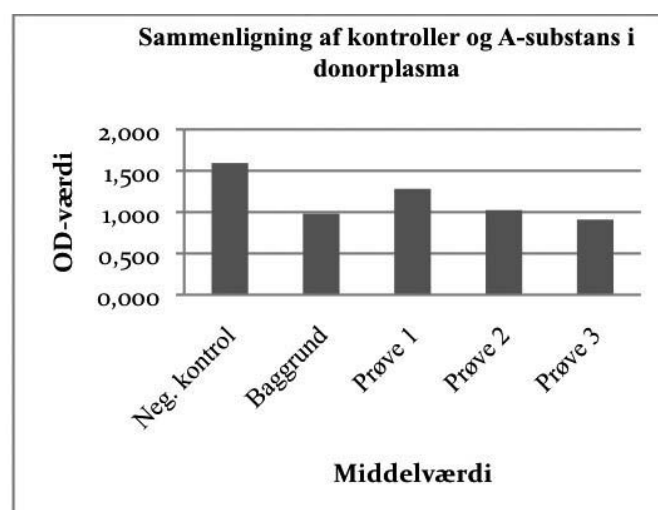
Udarbejdelsen af den praktiske del viste sig at være en udfordring i form af høje baggrundsmålinger, forhøjede negative kontroller, store afvigelser på dobbeltbestemmelser og uidentificerede uspecifikke bindinger m.m.

Der forekom ingen direkte brugbare resultater fra dette studie til konkret sammenligning mellem mængden af substans i plasma og plasmatypen.

Jeg har i denne artikel valgt at fremhæve resultaterne, som illustrerer præcisionen mellem dobbeltbestemmelserne samt assayets usikkerhed og udeladt resultater for udviklingsprocessen med variationen af antistofkoncentrationer m.m..

Blokering

Uspecifikke bindinger kan forekomme på to måder: Enten ved at antistoffer binder sig til plastoverfladen, eller at antistofferne binder sig til prøvens matrix. Det første forebygges ved at blokere frie bindingspladser på plastoverfladen med inaktive proteiner såsom Tween-20 eller BSA.



Figur 3: Visuel illustration af kontroller samt et udvalg af donorprøver. Her ses, at der forekommer en højere OD-værdi for den analyserede negative kontrol i forhold til donorprøverne, hvilket teoretisk ikke burde være en mulighed, da den negative kontrol ikke indeholder A-substans.

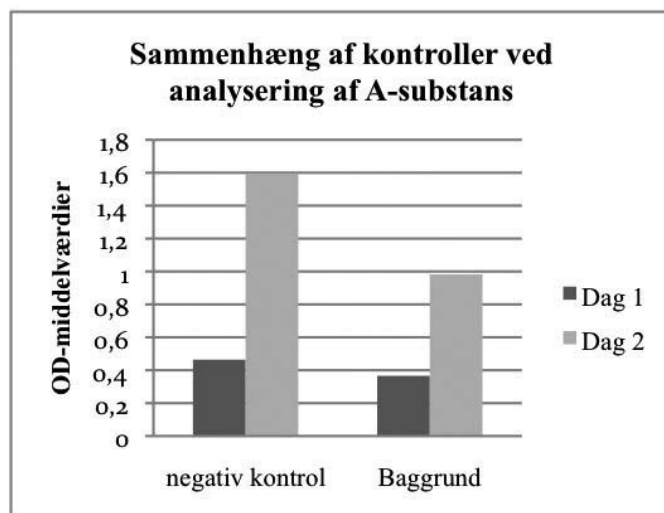
De uspecifikke bindinger i form af krydsreaktioner, hvor antistoffer binder til antigen-determinanter, der minder om den specifikke antigendeterminant. Disse bindinger er svage og kan ofte brydes ved vaskeprocedurer. Høj specificitet opnås, når antistoffets affinitet til de ønskede determinanter er væsentlig større end til krydsreagerende determinanter.

Kontroller

På figur 3 ses, at værdierne for den negative kontrol er højere end for den analyserede substans i A-plasma i samtlige tilfælde, samt at baggrundsmålingerne har en højere OD-værdi end prøve 3.

Dette resulterer i, at resultaterne for analyseprøverne er uanvendelige, da de negative kontroller ikke giver et negativt analyseresultat, og det ikke med sikkerhed kan garanteres, at de målte substansværdier i plasma er reelle.

På figur 4 ses variationen på samme kontroller analyseret på to forskellige dage. Her ses signifikant forskel. Beregnede CV%-værdier for disse kontroller ligger henholdsvis på CV% = 77,6 for den negative kontrol og CV% = 64,6 for baggrund, hvilket er helt uacceptabelt og langt over det acceptable på 10 %.



Figur 4: Illustration af kontroller med dagen som variabel. Der forekommer signifikant forskel på analyseresultaterne, alt efter hvilken dag de er analyseret, selv om analyse-forholdene er identiske.

Forventede resultater

Donorprøverne blev som tidligere nævnt inden påbegyndelse af assayet fænotype-bestemt. Hvis assayet var kommet til at fungere optimalt, kunne det forventes, at forarbejdet i bestemmelsen af fænotypen ville have vist sig i form af kvantitative OD-værdier.

I artiklen "The amount of blood group A substance on plate-

lets is proportional to the amount in plasma" af J. G. Kelton et al. beskrives, at der forekommer en sammenhæng mellem mængden af A-substans i plasma og fænotypen, A1 og A1-. yderligere sammenholdt med serologiteorien om blodtyper ville det være forventet, at donorer med fænotypen A1 ville besidde en større mængde A-substans, da disse individer har flere antigener på erythrocytterne og dermed en større mængde substans i plasma.

I produktbeskrivelsen for BRIC145 beskrives, at 20 % af individer med blodtype A ikke udskiller A-substans, fordi deres udskillelse af sekret ikke indeholder H-substans, og A-substansen dannes ud fra denne H-substans. Trods dette er individerne stadig blodtype A. Denne konstatering er relevant, da det netop er denne substans, der ønskes målbar. Jeg burde på denne teoretiske baggrund i en færdigudviklet ELISA-assay kunne forvente, at 20 % af måleresultaterne ville forekomme negative for blodtype A-donorer. Dette er dog ikke en mulig observation i de tilgængelige resultater i denne undersøgelse, da der forekom konsekvent forhøjede analyseresultater. Denne konstatering samt observation af forhøjede måleresultater og manglen på de gennemsnitlige 20 % negative prøver understøtter endnu en gang uklarheden om specificiteten for dette ELISA-assay og forekomsten af uspecifikke bindinger.

Uspecifikke bindinger

Det primære detektionsantistof Seraclone anti-A er specifikt rettet mod A-substans. Teoretisk set forekommer der ikke nogen form for A-substans i den negative kontrol, der består af O-plasma, eller i blindprøven bestående af 2%BSA 1%Tween20. Alligevel forekom ekstremt høje OD-værdier på over 0,550 uanset blokering for den negative kontrol (grænseværdi 0,100).

Samtidig sås, at hvis Seraclone anti-A undlades, forekommer stadig relativt høje værdier for både baggrund lige omkring OD-0,100, og den negative kontrol OD >0,140. Dette tyder på, at der forekommer noget uspecifikt i form af anti-IgM-AP også. Da Seraclone anti-A er det eneste IgM-antistof i mikrotiterbrøndene, er det svært at argumentere for, hvor de uspecifikke bindinger af det sekundære detektionsantistof anti-IgM-AP vil skulle binde uspecifikt, da antistoffet bindes til FC-delen på IgM-antistoffet (Seraclone anti-A). Den eneste mulighed kunne være, at anti-IgM-AP er uspecifikt og har mulighed for at binde til et lignende protein, hvis opbygningsstruktur minder om Seraclone anti-A.

Fejlkilder

I et forsøg på at finde årsagen til de uforståeligt høje baggrunde og negative kontrolværdier opsatte jeg et afpipetteringsforsøg med fokus på, om min egen afpipetteringsteknik kunne

Table 1: Bearbejdede analyseresultater for afpipeteringsteknik, Ud over at pladerne er afpipetteret af forskellige personer, forekommer temperaturen som variation i analyseassayet. CV%-acceptintervallet = 10 %.

SAMMENLIGNING AF AFPIPETTERINGSTEKNIK	Neg. kontrol	Blind	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5
Prøveplads			2A, 2B	5A, 5B	8A, 8B	10A, 10B	11A, 11B
Plade 1, 37 °C	0,565	0,566	0,661	0,620	0,553	0,442	0,493
Plade 2, stuetemperatur.	0,554	0,497	0,631	0,592	0,540	0,474	0,528
Middel	0,559	0,531	0,646	0,606	0,546	0,458	0,511
SD	0,008	0,049	0,022	0,020	0,010	0,022	0,025
CV%	1,4	9,2	3,3	3,3	1,8	4,9	4,9

være årsagen til de uforståelige resultater. Det ses på tabel 1, at 3 ud af 5 af resultaterne for analyseprøverne ligger under de målte OD-middelværdier for henholdsvis den negative kontrol og blindprøven. I tabel 1 er yderligere beregnet middel, SD og CV%, hvilket illustrerer, hvor stor spredningen og sammenligningen mellem de to assays er. Ingen af CV%-værdierne overskrider de 10 %, som er sat som grænseværdi, hvilket betyder, at variationen mellem de to afpipeteringsteknikker ikke er forskellig og dermed ikke har betydning for resultaterne. Jeg kan på denne baggrund udelukke min egen afpipeteringsteknik som fejlkilde.

Ud over de fremviste resultater og diskuterede problemstillinger blev bl.a. ELISA-vaskeren udelukket som en fejlkilde. Jeg optog kontakt til to af forfatterne på artiklen, dog blev der ikke fundet nogen løsning på assayet.

Konklusion

Det var ikke muligt at udvikle et ELISA-assay til detektion af A-substans i henholdsvis A- og AB-plasma. Der sås signifikant forskel imellem dobbeltbestemmelserne CV% = $\geq 10,0$ markant høje OD-målinger på negative kontroller samt blindværdier f.10,1. Hvilket bevirker, at resultaterne er utroværdige og uegnede.

Perspektivering

Det ville være interessant at bruge mere tid på udviklingen af ELISA-assayet til detektion af A-substans i plasma. Efter korrespondance med professor Urs Nydeegger, medforfatter på "Soluble type A substance in fresh-frozen plasma as a function of ABO and Secretor genotypes and Lewis phenotype," og professor Robert Rieben kunne man på deres anbefalinger og erfaring med ELISA opsætte ELISA-assayet på følgende måde: Efter coating med BRIC145 at banke opløsningen ud og dermed und-

lade vask, evt. vask med rent PBS (-Tween20), dernæst tilsætte 300µl blokeringsbuffer PBS 1-3% BSA i 1 time ved 37 °C. Derefter vaske med PBS/Tween20, da Tween20 forhindrer bindinger af blokeringsmidlet, men samtidig blokerer for frie bindinger af A-substans. De resterende reaktioner kan forløbe som afprøvet i dette assay. Derudover kunne assayet afprøves med et andet anti-IgM-antistof. ■

Referencer:

- 1 Dickmeiss, Ebbe, Dziegiel, Morten & Taaning, Ellen. (2008). *Kompendium til transfusionsmedicin og graviditetens immunologi*. København: Klinisk Immunologisk Afdeling, Rigshospitalet.
- 2 Achermann, F. J. et al. (2005) *Soluble type A substance in fresh-frozen plasma as a function of ABO and Secretor geno-types and Lewis phenotype*. Elsevier, Transfusion and Alheresis Science 32, 255-262
- 3 Harmening, D. M. (2005). *Modern Blood banking and transfusion practices (5th ed.)* Philadelphia: FA Davis.
- 4 Andersen, Hans, Sørensen, B. Ulf & Thomsen, Elsebeth. (2005). *Immunkemiske metoder – Teori og praksis. (1st ed.)* Danmark: Århus
- 5 NHS, Blood and Transplant (2012) *IB-GRL RESEARCH PRODUCTS DATA SHEET*, Lokaliseret d. 9. maj 2012 på <http://ibgri.blood.co.uk/ResearchProducts/Data-sheets/pdf%20Ddatasheets/BRIC%20145.pdf>