

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**D-dimer-specifikus monoklonális ellenanyagok  
előállítása, jellemzése és diagnosztikai  
alkalmazhatóságuk vizsgálata**

PhD értekezés

Török-Nagy Beáta

2020

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Dénes Béla, az állatorvos-tudomány kandidátusa, dr. habil., c. egyetemi tanár

(igazgatóhelyettes, laboratóriumvezető)

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Immunológiai Laboratórium

témavezető

Dr. Antal József, Ph.D.

(minőségügyi szakértő)

Nemzeti Orvostechnikai Eszköz Megfelelőségértékelő és Tanúsító Kft.

témabizottság tagja

Dr. Vajdovich Péter, Ph.D.

(egyetemi docens, tanszékvezető)

Állatorvostudományi Egyetem,

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n..... sz. példány.

.....

Török-Nagy Beáta

## TARTALOMJEGYZÉK

Ábrák jegyzéke.....	8
Táblázatok jegyzéke.....	10
Rövidítések jegyzéke .....	12
1 Összefoglalás.....	14
2 Bevezetés .....	15
3 Irodalmi áttekintés .....	16
3.1 A D-dimer fehérjék keletkezése, felépítése .....	16
3.2 A D-dimer mérés humán diagnosztikai jelentősége.....	18
3.2.1 Történeti áttekintés.....	18
3.2.2 D-dimer diagnosztikai próbák típusai, történetük.....	19
3.2.3 Kvantitatív latex agglutinációs D-dimer teszt .....	20
3.2.4 A D-dimer tesztek standardizációs, harmonizációs nehézségei .....	21
3.2.5 Diagnosztikai próbákat jellemző mutatók.....	24
3.2.6 A VTE betegség leírása, előfordulása .....	27
3.2.7 A VTE diagnosztizálása D-dimer koncentráció meghatározással és képképző módszerekkel.....	27
3.2.8 Disseminált intravasculáris coagulatio diagnosztizálása.....	29
3.3 A D-dimer vizsgálat diagnosztikai jelentősége az állatgyógyászatban.....	29
3.3.1 D-dimer koncentráció vizsgálata kutyák egyes megbetegedéseinél .....	30
3.3.2 A D-dimer tumormarker szerepe human- és állatgyógyászati vonatkozásban.....	31
3.3.3 D-dimer tesztek validálása kutyáktól származó minták vizsgálata céljából .....	31

3.4	A D-dimer próbákban alkalmazott ellenanyagok ismertetése .....	32
3.4.1	Szerkezeti felépítés .....	32
3.4.2	Monoklonális ellenanyagok .....	34
3.5	Az ellenanyagok immobilizálása latex agglutinációs próbákban .....	35
3.6	Célkitűzések.....	36
4	Anyag és módszer.....	38
4.1	Monoklonális ellenanyag előállítás .....	38
4.1.1	D-dimer antigén preparálása .....	38
4.1.2	Immunizálás.....	38
4.1.3	Sejtfúzió .....	39
4.1.4	Hibridóma szelekció .....	40
4.1.5	Indirekt ELISA vizsgálat .....	40
4.1.6	Klónozás .....	41
4.2	Immunológiai vizsgálatok, karakterizálás.....	41
4.2.1	Ellenanyag izotípus vizsgálat .....	41
4.2.2	Keresztreakciók vizsgálata.....	42
4.2.3	Az antigén molekulatömegének vizsgálata gélelektroforézissel.....	42
4.2.4	Az antigén Western blot vizsgálata.....	43
4.2.5	Epitóp meghatározás .....	43
4.3	Monoklonális ellenanyag termeltetése.....	45
4.3.1	Sejtbank létrehozása.....	45

4.3.2	Sejtek sejtbankból történő felszaporítása és fenntartása.....	46
4.3.3	Ellenanyag termelés miniPERM® bioreaktorban.....	46
4.3.4	Ellenanyag termelés FiberCell® hollow fiber reaktorban .....	47
4.4	Monoklonális ellenanyag tisztítása és koncentrálása.....	50
4.4.1	Tisztítás I.....	50
4.4.2	Tisztítás II.....	51
4.4.3	Ellenanyag koncentráció és szűrés .....	51
4.5	A monoklonális ellenanyag diagnosztikai tesztben történő alkalmazása.....	52
4.5.1	Az ellenanyag latex mikroszemcsékre való rögzítése.....	52
4.5.2	A D-dimer reagens használata koagulométeren.....	53
4.6	A Dia-D-DIMER teszt humán klinikai vizsgálata .....	54
4.6.1	Mérési körülmények .....	54
4.6.2	A vizsgálatban szereplő D-dimer tesztek jellemzői .....	55
4.6.3	Statisztikai elemzés.....	56
4.7	A Dia-D-DIMER teszt állatorvosi alkalmazása .....	56
4.7.1	Mérési körülmények .....	56
4.7.2	Statisztikai elemzés.....	57
5	Eredmények.....	58
5.1	Monoklonális ellenanyag előállítása .....	58
5.1.1	D-dimer antigén.....	58
5.1.2	Hibridóma sejtvonalak.....	58

5.1.3	Klónozott sejtvonalak .....	59
5.1.4	Ellenanyag termeltetés.....	60
5.2	Monoklonális ellenanyagok jellemzése.....	60
5.2.1	Ellenanyagok izotípusának vizsgálata.....	60
5.2.2	Keresztreakciók vizsgálata.....	60
5.2.3	Epitóp meghatározás .....	62
5.3	A 2B9 monoklonális ellenanyag diagnosztikai alkalmazása.....	65
5.3.1	Humán minták D-dimer koncentrációjának mérése .....	66
5.3.2	Kutyáktól származó minták D-dimer koncentrációjának mérése.....	73
6	Megbeszélés .....	80
6.1	Az előállított ellenanyag tulajdonságai.....	80
6.1.1	A keresztreakciók vizsgálatának jelentősége .....	80
6.1.2	Az epitóp térképezés értékelése .....	81
6.2	Az előállított ellenanyag gyakorlati alkalmazása.....	84
6.2.1	A Dia-D-DIMER teszt humán klinikai vizsgálata .....	84
6.2.2	A Dia-D-DIMER teszt kutyáktól származó mintákon való alkalmazása.....	86
6.3	Konklúzió .....	89
7	Új tudományos eredmények.....	91
8	Irodalomjegyzék .....	92
9	A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	102
9.1	Lektorált, impakt faktorra bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk (szakcikkek).....	102

9.2	Konferencia prezentációk.....	102
9.3	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája...	102
10	Köszönetnyilvánítás .....	103
11	Melléletek.....	104

## ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra	A D-dimer keletkezésének mechanizmusa .....	17
2. ábra	A D-dimer molekula kereszt kötése .....	18
3. ábra	Egy diagnosztikai próba adott betegségre vonatkoztatott ROC görbéjének ábrázolása .....	26
4. ábra	Az ellenanyag szerkezete, antigénfelismerés .....	33
5. ábra	Hibridóma sejt előállítása .....	35
6. ábra	Laboratóriumi Balb/c egér i.p. oltása a D-dimer antigénnel történő immunizálás során .....	39
7. ábra	A D-dimer felszíni epitóp lokalizálásának menete .....	45
8. ábra	MiniPERM bioreaktor hibridóma sejtekkel beoltott állapotban .....	47
9. ábra	MiniPERM bioreaktorok a forgató egységgel .....	47
10. ábra	FiberCell® bioreaktor működés közben, a CO <sub>2</sub> inkubátorba helyezve .....	48
11. ábra	A FiberCell® bioreaktor rendszerének felépítése .....	48
12. ábra	A FiberCell® bioreaktor hollow fibre rendszerének működési elve .....	48
13. ábra	Immunturbidimetriás D-dimer próba mérési elve .....	54
14. ábra	D-dimer antigén SDS-PAGE és Western blot analízise .....	58
15. ábra	Hibrid sejtek mikroszkópos felvétele, két héttel a sejtfúziót követően .....	59
16. ábra	Klónozás során egy sejtből kialakult sejtcsoport, a mikrotitráló lemez egy vajatában .....	59
17. ábra	D-dimer antigén Western blot vizsgálata 2B9 monoklonális ellenanyaggal .....	63
18. ábra	A fibrin D-monomer A, B, C láncainak aminosav szekvenciája .....	64



19. ábra	A fibrin D-fragmentum láncai (A), epitóp felszínei és a meghatározott, emésztett fragmentumok 3D-s modellje (B).....	65
20. ábra	Bland-Altman korreláció az INNOVANCE® D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di tesztek között .....	66
21. ábra	Bland-Altman korreláció az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek között .....	67
22. ábra	Lineáris regresszió ábrázolása az INNOVANCE® D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di tesztekkel mért mintákon. ....	67
23. ábra	Lineáris regresszió ábrázolása az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztekkel mért mintákon.....	68
24. ábra	STA®-Liatest® D-Di teszt diagnosztikai hatékonyságát jellemző ROC görbe ...	71
25. ábra	Dia-D-DIMER teszt diagnosztikai hatékonyságát jellemző ROC görbe.....	72
26. ábra	A malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjaiban, illetve a kontroll csoportban mért D-dimer koncentrációk ábrázolása boxplot diagrammal .....	77
27. ábra	Az egyes daganattípusok és a kontroll csoportban mért D-dimer koncentrációk ábrázolása boxplot diagrammal.....	77
28. ábra	INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek Bland-Altman analízise.....	79

## TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat	A FiberCell® bioreaktor rendszer beoltása, fenntartása .....	50
2. táblázat	A vizsgálatban szereplő D-dimer próbák analitikai paraméterei.....	55
3. táblázat	A különböző sejtvonalak által termelt ellenanyagok fragmentumokkal adott keresztreakciói.....	61
4. táblázat	A 2B9 sejtvonal különböző klónjai által termelt ellenanyagok keresztreakciói..	62
5. táblázat	Pozitív-illetve negatív csoportokba sorolt páciensek a három próba esetében	68
6. táblázat	Khí-négyzet elemzés, az INNOVANCE® D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di tesztek pozitív és negatív eredményei alapján.....	69
7. táblázat	Khí-négyzet elemzés, az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek pozitív és negatív eredményei alapján .....	69
8. táblázat	Az STA®-Liatest® D-Di tesztére megállapított szenzitivitás és specificitás értékek (százalékban), változtatott küszöbértékek mellett .....	70
9. táblázat	A Dia-D-DIMER tesztre megállapított szenzitivitás és specificitás értékek (százalékban), változtatott küszöbértékek mellett.....	70
10. táblázat	Accuracy és Youden index értékek STA®-Liatest® D-Di különböző küszöbértékei esetében .....	72
11. táblázat	Accuracy és Youden index értékek Dia-D-DIMER különböző küszöbértékei esetében .....	73
12. táblázat	Malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjainak, illetve a kontroll csoport mintáiban mért D-dimer koncentráció értékek eloszlása.....	73
13. táblázat	A kontroll és daganatos kutyák csoportjaiban mért D-dimer koncentráció tartományok, középértékek, és p-értékek .....	74
14. táblázat	Malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjaiban mért D-dimer koncentráció tartományok, középértékek) és p-értékek.....	74

15. táblázat	A malignitás fokát jelölő csoportok D-dimer koncentráció tartományai és középértékei.....	75
16. táblázat	A daganat stádiumát jelölő csoportok D-dimer koncentráció tartományai és középértékei.....	75
17. táblázat	Az egyes daganattípusok és a kontroll csoportaiban mért D-dimer koncentráció értékek eloszlása.....	76
18. táblázat	Az egyes daganattípusok és a kontroll csoport D-dimer koncentráció tartományai, középértékei és p-értékek.....	76
19. táblázat	A Dia-D-DIMER teszt, daganatokra vonatkoztatott szenzitivitás, specificitás, PPV, NPV értékei százalékban kifejezve, különböző küszöbértékek alkalmazása esetén.....	78
20. táblázat	A kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer tesztek mérési elve és az alkalmazott ellenanyagok.....	82

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CE	Conformité Européenne; európai megfelelés
CFA	complet Freund adjuvant; komplett Freund adjuváns
CLIA	kemilumineszcens enzimmunmetriás teszt
CNBr	cianogén-bromid
CT	computer tomograf
DAB	diaminobenzidine
DIC	disseminated intravascular coagulation; disszeminált intravascularis coagulatio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium; tápfolyadék
DMSO	dimetil-szulfoxid
DVT	deep vein thrombosis; mélyvénás thrombosis
ECS	extracellular space; sejtközi tér
EDAC	1-etil-3-dimetilaminopropil karbodiimid
FCS	fetal calf serum; foetalis borjú serum
FEU	Fibrinogen equivalent unit; fibrinogén ekvivalens egység
FDP	fibrin degradation products; fibrin degradációs termékek
FN	false negative; tévesen negatív
FP	false positive; tévesen pozitív
FPLC	Fast protein liquid chromatography; gyors fehérje-folyadékkromatográfia
HAT	hipoxantin-aminopterin-timidin szelekciós tápfolyadék
HGRH	high-glucose rate harvest; magas glükóz rátájú aratás
HGPRT	hypoxantin-guanin-foszforiboziltranszferáz
HMWF	high molecular weight fraction; nagy molekulásúlyú frakció
HT	hipoxantin-timidin szelekciós tápfolyadék
IFA	incomplet Freund adjuvant; inkomplett Freund adjuváns
IHC	Immunohistochemistry; immunhisztokémia
IMHA	Immune-Mediated Hemolytic Anemia; immun-közvetített hemolitikus anémia
i.p.	intraperitoneális
LGRH	low glucose rate harvest; alacsony glükóz rátájú aratás
LMWF	low molecular weight fraction; kis molekulásúlyú frakció
MAb	monoclonal antibody; monoklonális ellenanyag
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; 2-morfolino-etánszulfonsav
MVT	mélyvénás thrombosis
N/A	not available; adat nem áll rendelkezésre

NHS ..... N-hidroxi-szulfoszukcimid  
 NPV ..... negative predictive value; negatív prediktív érték  
 PBS ..... phosphat-buffered saline; foszfáttal pufferelt sóoldat  
 PE ..... pulmonaris embolism; tüdőembólia  
 PMSF ..... fenilmetilszulfonid fluorid  
 POC ..... point-of-care; betegágy melletti teszt  
 PVDF ..... polyvinylidene difluoride; polivinilidén difluorid membrán  
 PPV ..... positive predictive value; pozitív prediktív érték  
 ROC ..... Receiver Operating Characteristic; vevő működési karakterisztika görbe  
 RPMI ..... Roswell Park Memorial Institute; tápfolyadék  
 s.c. .... subcutan  
 SDS-PAGE ..... sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis  
 TMB ..... tetra-metilén benzidin  
 TN ..... true negative; valós negatív  
 TP ..... true positive; valós pozitív  
 VTE ..... venous thromboembolism; vénás thromboembolia

## 1 ÖSSZEFOGLALÁS

A D-dimer egy fibrin degradációs fehérje, amely a vér alvadásakor a szekunder fibrinolysis során keletkezik. A szervezet fokozott trombotikus aktivitásának eredményeképpen koncentrációja a vérben megemelkedik, amelynek értéke D-dimer diagnosztikai próbával határozható meg. A kereskedelemben elérhető D-dimer tesztek gyakran egymástól eltérő eredményeket adnak, specificitásukban, szenzitivitásukban is jelentősen különbözhetnek.

Elsődleges célunk az volt, hogy egy új monoklonális ellenanyagot állítsunk elő, amely megfelelő specificitással ismeri fel a D-dimer antigént, majd tulajdonságait jellemezzük és felhasználásával egy új, latex agglutináció elvén alapuló, immunturbidimetriás diagnosztikai tesztet fejlesszünk, melynek diagnosztikai teljesítményét és alkalmazhatóságát is vizsgáljuk.

A monoklonális ellenanyagokat termelő sejteket hibridóma technikával állítottuk elő, majd végponthígításos módszerrel klónoztuk. A hibridómák által termelt ellenanyag titerét saját fejlesztésű indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Hét hibridóma sejtvonalat választottunk ki, és az általuk termelt ellenanyagokat jellemeztük, továbbá vizsgáltuk a fibrinogénnel, illetve fibrin/fibrinogén degradációs termékekkel adott keresztreakcióikat is. Az előnyös tulajdonságai révén a 2B9 jelölésű ellenanyagot választottuk ki, melynek az epitóp térképezését a D-dimer antigén emésztésével, majd a fragmentumok Western blot analízisével és szekvenálásával végeztük. A 2B9 jelölésű hibridóma sejtvonalat folyamatosan fenntartottuk, és az ellenanyagot két különböző típusú bioreaktor rendszerben termeltettük. A 2B9 ellenanyagot egy új fejlesztésű immunturbidimetriás tesztbe építettük be, az ellenanyagot latex szemcsék felületére kötve fel. Az előállított új D-dimer teszt, Dia-D-DIMER néven európai megfelelés (CE) minősítéssel került forgalomba.

Munkánk következő fázisában a Dia-D-DIMER teszt humán klinikai teljesítményét, illetve állatorvosi vonatkozású diagnosztikai alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Vénás thromboembolia gyanújával kezelt 158 beteg mintájának D-dimer értékeit határoztuk meg a Dia-D-DIMER teszttel és két másik, kereskedelmi forgalomban lévő D-dimer próbával. Célunk az volt, hogy a három tesztet összehasonlítsuk, vizsgáljuk az eredmények korrelációját, illetve a küszöbértékek optimalizálásával összehangoljuk a tesztek szenzitivitását és specificitását. Az elsődlegesen humán minták vizsgálatára fejlesztett D-dimer tesztet állatoktól származó minták mérésére is alkalmaztuk. Összesen hetven egészséges, illetve neopláziás kutyától származó vérplazma mintát vizsgáltunk meg, különösképpen az emelkedett D-dimer érték és a daganat típusok, illetve a daganat progressziójának összefüggéseire.

## 2 BEVEZETÉS

A humán klinikai gyakorlatban a D-dimer koncentráció mérésének elsősorban a mélyvénás thrombosis (DVT) és tüdőembólia (PE) kizárásában van szerepe. A negatív teszteredmények esetén ugyanis a kis kockázatú betegeknél nagy biztonsággal zárható ki mindkét kóros állapot. Ezen kívül a D-dimer érték meghatározásának fontos szerepe van a disszeminált intravasculáris coagulatio (DIC) diagnosztizálásában, illetve a betegség monitorozásában is (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

A D-dimer érték meghatározása állatorvosi szempontból is fontos, ugyanis a fokozott véralvadással járó állapotok az állatokban is emelkedett D-dimer koncentrációt eredményeznek. Elsősorban a kutyák, macskák és lovak esetében készítették tanulmányokat, amelyekben a D-dimer állatgyógyászatban használt diagnosztikai értékével foglalkoztak (El-Zahar és mtsai., 2018; Cesarini és mtsai., 2010; Tholen és mtsai., 2009). Kutyáknál elsősorban a tüdőembólia és a disseminált intravasculáris coagulatio diagnosztizálásában van jelentősége (Stokol, 2003).

A kereskedelmi forgalomban számos, a D-dimer koncentráció meghatározására alkalmas diagnosztikai próba vásárolható, azonban ezeknél általános problémát jelent, hogy az egyes tesztek tulajdonságaikban egymástól jelentősen eltérhetnek. Gyakori, hogy a mintában jelen lévő D-dimert és egyéb degradációs termékeket az egyes tesztek eltérő mértékben képesek azonosítani, gyakran adnak keresztreakciókat, ezáltal specifitásukban is különbözhetnek. Így az egyes próbák eredményei nehezen összehasonlíthatók, s mindezek zavarják a klinikai döntéshozatalt. Ezért úgy látjuk, hogy szükség és igény van olyan ellenanyagok, illetve diagnosztikai tesztek előállítására, amelyek megfelelő specifitással ismerik fel a mintában lévő D-dimer fehérjét.

### 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

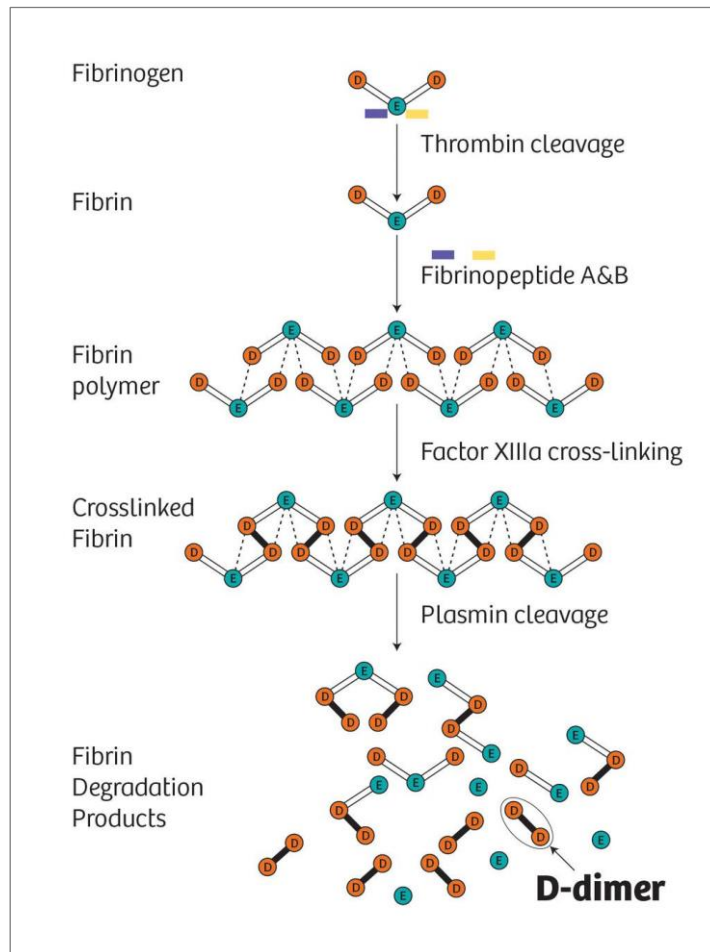
#### 3.1 A D-dimer fehérjék keletkezése, felépítése

A D-dimer egy fibrin degradációs termék, mely a keresztkötött fibrin plasmin általi emésztése során keletkezik a vérben. Ennélfogva a D-dimert a coagulatio és fibrinolysis aktiválódásának biomarkereként tartják számon.

Sérülés esetén az érrendszerben reakciók sorozata indul el, a haemostasis rendszere működésbe lép, mely a vérzés csillapítását szolgálja. Elsőként a sérülésnél helyi vasoconstrictio lép fel, az erek összeszűkülnek, melyet a thrombocyták subendotheliális kollagénrosthoz való adhéziója, aktiválódása és aggregációja követ. A véralvadási kaszkád beindulásával, proteolitikus reakciók során a prothrombinból thrombin keletkezik, mely az oldott fibrinogént fibrin monomerekké és további peptidekké (Fibrinopeptid A és B) hasítja. Ezt követően a fibrin monomerek egymáshoz kötve fibrin polimert alkotnak, melyeket a szintén thrombin által aktivált XIIIa faktor kovalens kötésekkel keresztköt, ezzel fibrinhálózatot hozva létre. A keresztkötött szálak közé vörsejtek tapadnak, így hozva létre az alvadékot, megakadályozva a további vérzést.

Az eredeti állapot helyreállításához megindul a fibrinolysis folyamata, a keletkezett alvadék plasminnal történő enzimatis lebontása. A plasmin a vérben jelenlévő plasminogénból, mint proenzimből proteolitikus aktiválás során keletkezik, melyet a szöveti és urokináz típusú plasminogénaktivátorok indítanak meg. A fibrin plasminnal történő hasítása során keletkeznek széles molekulatömeg-skálát lefedő, a hagyományosan fibrin degradációs termékeknek (FDP) nevezett proteolitikus fragmentumok. A keresztkötött fibrin proteolízise során végtermékként D-dimer és E-fragmentum keletkezik, melyek fiziológias körülmények között D-dimer/E komplexet alkotnak, lásd 1. ábra (Favresse és mtsai., 2018; Fonyó, 1997; Gaffney és mtsai., 1975).

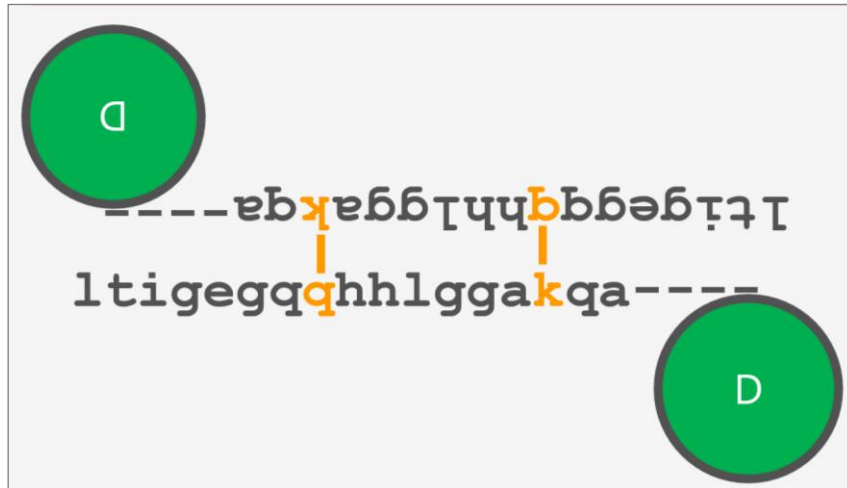




1. ábra A D-dimer keletkezésének mechanizmusa

*Forrás: www.siemens-healthineers.com*

A D-dimer szerkezetileg két D-doménből áll, melyeket kovalens kötés köt össze a Y lánc C-terminálisánál (Dempfle, 2005a) (3. ábra). Nem egységes, egyetlen molekulatömeggel definiálható molekula, a különféle fragmentumok molakulatömege átlagosan a 150-200 kDa tartományba esik. A keresztkötött fibrin enzimatis hasítása során keletkező egyéb fibrin degradációs termékek, nagy-molekulatömegű X-oligomerek ugyancsak tartalmazzák a dimerizált D-doméneket: DY (247 kDa), YY (285 kDa), DXD (461 kDa), YXD (500 kDa), XY (391 kDa) (Francis és mtsai., 1980). Az X-oligomerek hosszabb ideig, magas plasmin koncentrációval történő emésztése során további D-dimerek keletkeznek.



**2. ábra** A D-dimer molekula keresztkötése

## 3.2 A D-dimer mérés humán diagnosztikai jelentősége

### 3.2.1 Történeti áttekintés

A klinikusok az 1960-as években kezdték el tanulmányozni a fibrin plasminnal történő emésztése során keletkező FDP-et, mint az intravasculáris fibrinolysis indikátorait. Az FDP mérését először a DIC követésére használták. 1972-ben felvetették, hogy a keresztkötött fibrin degradációs termékeinek detektálása diagnosztikai célból is hasznos lehet. Nehézséget okozott, hogy a kimutatásra használt poliakrilamid-gélelektroforézist nem alkalmazták rutinszerűen a klinikai gyakorlatban (Gaffney, 1972). A következő évben azonosították a legkisebb fibrin degradációs terméket, a D-dimert (Gaffney, 1973). Az 1980-as évek közepén írták le az első D-dimerre specifikus monoklonális ellenanyagra alapuló próbát, amely az előzőekhez képest nagyobb specificitással mutatta ki a D-dimert, és még a plazma alacsony analit koncentrációja esetén is érzékenynek bizonyult (Greenberg és mtsai., 1987), így az FDP tesztet az érzékenyebb D-dimer teszt váltotta fel.

Számos klinikai állapot jelenléte társult a vérben megemelkedett D-dimer értékhez, mint például a DVT, PE, DIC és artériás thrombosis (Elms és mtsai., 1983; Whitaker és mtsai., 1984). A következő évtizedekben számos tanulmány támasztotta alá a korábbi megfigyelést, miszerint a D-dimer koncentráció megemelkedett a vénás tromboembóliában (VTE) szenvedő betegeknél. Megállapították, hogy meghatározott koncentráció érték alatt (küszöbérték) a VTE kizárható (Righini és mtsai., 2008).

Napjainkban a klinikai gyakorlatban a D-dimer koncentráció mérésének elsősorban a vénás thromboemboliás betegségek kizárásában van szerepe, különös tekintettel a mélyvénás thrombosisra és tüdőembóliára. Használják ezen kívül a DIC diagnózisának felállításában és monitorozásában is (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

### **3.2.2 D-dimer diagnosztikai próbák típusai, történetük**

Az első generációs D-dimer próbákat 1970-ben állították elő, melyek alkalmasak voltak mind a fibrinogén, mind a fibrin degradációs termékek kimutatására (Linkins és Takach Lapner, 2017). Ezeket az immunológiai próbákat kizárólag serum minták vizsgálatára tudták használni, elkerülve ezzel a fibrinogénnel fellépő keresztreakciót, amely a serummal ellentétben, a vérplazmában magas koncentrációban jelen van.

Az 1980-as évek elején a D-domént felismerő monoklonális ellenanyagok bevezetésével jelentős specificitás és szenzitivitás emelkedést értek el (Riley és mtsai., 2016). Ezek a próbák már lehetővé tették a D-dimer molekulán lévő epitópok specifikus felismerését, mely az FDP és a nem kereszt kötött fibrin fragmentumok esetében nem volt lehetséges. További előnyt jelentett, hogy a fibrinogénnel adott keresztreakciók nagymértékben csökkentek, így lehetőség nyílt a vérplazma minták használatára is.

Eleinte főként enzimmel kötött immunszorbens vizsgálat (ELISA) alapú próbákat alkalmaztak, elsősorban kutatási céllal. Ezek a próbák a „szendvics ELISA” elvén működnek. Egy „befogó” (capture) ellenanyaggal lehet a D-dimer antigént a lemezhez kötni, majd inkubáció után egy jelölt ellenanyag kapcsolódik az immobilizált antigénhez, detektálható színreakciót adva. Bár ez utóbbi rendszer nagyon érzékenynek bizonyul, mégis hátrányt jelent az, hogy időigényes, manuális és egyben szakképzett munkát és megfelelő laboratóriumi háttérrel igényel.

Az ezután kifejlesztett módszerek közé tartoztak a kvalitatív latex agglutinációs tesztek, amelyek ellenanyaggal borított latex mikroszemcséket tartalmaznak, használatuk során a létrejött agglutináció vizuális leolvasással történik. Az automatizált latex agglutinációs tesztek (vagy a latex alapú immunturbidimetriás tesztek) előállításával már lehetővé vált a D-dimer kvantitatív meghatározása. Ez utóbbi tesztek nagy előnye a gyorsaság, amellet, hogy hasonló szenzitivitás érhető el velük, mint a konvencionális ELISA próbákkal (Favresse és mtsai., 2018; Riley és mtsai., 2016).

Az 1990-es években a bioMérieux cég állított elő egy, az enzim-kapcsolt immunfluoreszcencia (ELFA) elvén működő tesztet, mely specificitásában és szenzitivitásában hasonló az ELISA próbákhoz, emellett további előnye, hogy automatizált és rövid mérési idővel pontosabb eredményt szolgáltat (Pittet és mtsai., 1996).

Napjainkban a kemilumineszcens enzim-immunmetriás próbák (CLIA) illetve a latex-alapú immunturbidimetriás próbák terjedtek el, de főként a betegágy melletti, úgynevezett „Point-of-care” (POC) gyakorlatban alkalmaznak immunkromatográfián alapuló próbákat. Az ilyen D-dimer tesztek előnye, hogy a kis méretű készülékkel rövid idő alatt eredményt kapunk, mely leginkább a házi orvosok körében terjedt el (Favresse és mtsai., 2018).

### **3.2.3 Kvantitatív latex agglutinációs D-dimer teszt**

Napjainkban legelterjedtebbek a latex agglutináción alapuló próbák. A mérés lényege, hogy a mintát és a latex reagenst összekeverik, a latexet borító ellenanyag és a mintában jelen lévő oligomer (jelen esetben dimer) antigén között immunkémiai reakció lép fel, az antigén-ellenanyag kötődések a latex szemcsék (polisztirol nanogyöngyök) agglutinációját eredményezik, amely fizikailag detektálható optikai jelet ad. A szemcsék fényszórásának intenzitása függ az agglutinátum méretétől, mely a reakció kezdetétől a végéig változik. A kvantitatív D-dimer teszteknel alkalmazott polisztirol szemcseméret 100-500 nm között változhat. A szemcsék egy vagy két specifikus ellenanyaggal borítottak. Az agglutináció turbidimetriásan, illetve nefelometriásan mérhető. Az előbbivel a mintán átjutó fény intenzitása mérhető, míg az utóbbival a mintáról adott szögben szóródó fény intenzitása detektálható.

A turbidimetriás mérés során az abszorbancia változás mértékét rögzítik a minta hozzáadása után. Adott idő alatt mért abszorbancia változás arányos a minta D-dimer koncentrációjával, mely kalibrációs görbe alapján számítható. A legtöbb ilyen típusú próba 10 percen belül eredményt ad (előkészített minta esetén), és klinikai kémiai analizátorokra és koagulométerekre egyaránt alkalmazható.

Az immunturbidimetriás D-dimer próba reakciómechanizmusának alapján – miszerint a D-dimer specifikus monoklonális ellenanyaggal borított latex mikroszemcsék a vérplazma minták D-dimer antigénjével találkozáva agglutinálnak – a monoklonális ellenanyagnak és az antigénnek az alábbi tulajdonságokkal kell rendelkeznie:

A monoklonáris ellenanyag	Az antigén (D-dimer)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• kellő aviditással és</li> <li>• kellő specificitással ismerje fel az epitópot, továbbá</li> <li>• ne adjon keresztreakciót a fibrinogénnel, és</li> <li>• monomer FDP-vel lehetőleg gyengén reagáljon, vagy ne adjon keresztreakciót.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• legalább két</li> <li>• specifikus, csak a D-dimerre jellemző (fibrinogénben rejtett) epitópot hordozzon,</li> <li>• melyek olyan távol helyezkednek el, hogy a két kötődő ellenanyag térbelileg egymást ne gátolja.</li> </ul>

### 3.2.4 A D-dimer tesztek standardizációs, harmonizációs nehézségei

A laboratóriumok D-dimer mérési eredményei között nagy variabilitás figyelhető meg, a nem pontos D-dimer eredmény interpretációs hibákhoz vezethet, így a klinikai döntéshozatalt, ezen keresztül pedig a betegbiztonságot is nagymértékben veszélyeztetheti, emiatt megkísérelték a mérés nemzetközi standardizálását – mindezt eddig sikertelenül.

Egy 2001-ben megjelent FACT elnevezésű (fibrin tesztek összehasonlító vizsgálata) nagy volumenű tanulmányban 23 kvantitatív D-dimer teszt (15 latex-alapú, 6 ELISA és 2 membrán-alapú teszt) eredményeit értékelték. Harminckilenc mintát lemérve az egyes tesztekkel, a szerzők azt találták, hogy az átlag értékek 630 és 13350 mg/L koncentrációk között voltak. Két próba esetében szignifikáns keresztreaktivitást tapasztaltak fibrinogén degradációs termékekkel. Továbbá azt is kimutatták, hogy az ELISA és latex-alapú próbák intenzívebben reagáltak a kis móltömegű kereszt kötött fibrin fragmentumokkal és a nagy móltömegű fragmentumokkal (Dempfle és mtsai., 2001).

Meijer és munkatársai (2006) a hét legelterjedtebben használt D-dimer tesztet vizsgálták 357 laboratórium bevonásával. Az eredményeik azt mutatták, hogy néhány próba akár 20-szor magasabb D-dimer koncentráció értéket is adott, a többi teszt D-dimer értékéhez képest.

Egy másik hasonló felmérésben 423 laboratórium vett részt. A megmért D-dimer koncentrációkat összehasonlítva, nagy variabilitást tapasztaltak az eredményekben, különösképpen a VTE kizárása szempontjából fontos küszöbérték közelében (Favresse és mtsai., 2018; Spannagl és mtsai., 2005).

Adam és munkatársai (2009) szerint a tesztek közötti különbségek egyik fő oka, hogy hiányzik egy általánosan elfogadott nemzetközi D-dimer standard, amelyhez a tesztek igazodhatnának, de további tényezők is befolyással bírnak. Egyrészt, a különböző tesztek más-más ellenanyagot építenek be a rendszerükbe, így az alkalmazott a D-dimer-specifikus

ellenanyag nem ugyanazt az epitópot ismeri fel az antigén felületén, hanem különbözőeket. Ennek következtében a különböző tesztek ellenanyagai más és más specificitással bírnak, így eltérő mértékben adnak keresztreakciókat is. Szinte minden teszt ellenanyaga keresztreakál bizonyos mértékben a keresztkötött D-dimeren kívül más fibrin, vagy fibrinogén degradációs termékkel, melyek a plazmában változó mennyiségben jelen vannak, s ez a teszt specificitásában jelentős különbségeket eredményez. Arra is van példa, hogy egy tesztben több különböző specificitású ellenanyagot is használnak.

Jelenleg a D-dimer kalibrátor anyaghoz a fibrin alvadék kontrollált enzimes emésztésével juthatunk. Ezért a gyártóknak biztosítaniuk kell a reprodukálható emésztési folyamat leírását, amely garantálja az azonos méreteloszlású degradációs termékek keletkezését. Ugyanis a kis vagy nagy molekulásúlyú fragmentumok (LMWF, HMWF) relatív összege is befolyásolhatja a teszt szenzitivitását (Reber és Moerloose, 2013).

Mindezek mellett interferenciát okozó anyagok (mint például a reumatoid factor, vagy heterofil ellenanyagok is okozhatnak különbségeket a tesztek között, mivel az egyes tesztek eltérő mértékben adnak keresztreakciót a zavaró, interferáló anyagokkal (Kricka, 1999; Robier és mtsai., 2014).

A különböző D-dimer tesztek heterogenitása miatt és a standardizáció/ harmonizáció hiányában a VTE kizárására használt küszöbértéket a helyi laboratóriumok szintjén kell igazolni, megerősíteni, ehhez a "British Committee for Standards in Haematology" irányelvei nyújthatnak útmutatást. Számos teszt gyártója is ajánlja, hogy a küszöbértékeket a laboratóriumok helyi szinten validálják (Adam és mtsai., 2009).

A fenti megközelítés azonban nem minden laboratórium számára gyakorlatias vagy kivitelezhető megoldás. Ebben az esetben a gyártó által megadott küszöbérték használható, feltéve, ha máshol már megbízhatóan validálták a próbát, illetve amennyiben az adott tesztnél nem tapasztalható jelentős eltérés a gyártási tételek között (Reber és Moerloose, 2013).

Az Egyesült Államokban végzett felmérés (CAP) szerint 1506 laboratóriumból 488, magasabb küszöbértékeket használt, mint amit a gyártó ajánlott, vagy ami a szakirodalomban közölt ajánlott érték volt (Olson és mtsai., 2013). Egy Európában készült tanulmány ugyancsak rávilágított arra, hogy a kísérleteikben részt vevő laboratóriumok 24%-a alacsonyabb, míg 55%-uk magasabb küszöbértéket alkalmaz, mint a gyártó által ajánlott érték (Reber és Moerloose, 2013).

Hager és Platt (1995) igazolták, hogy a D-dimer értéke az életkor előrehaladtával emelkedik. Az ADJUST-PE tanulmányban, idős korú betegek esetében vizsgálták a D-dimer VTE-t kizáró küszöbértékét. Vizsgálatuk során az 50 év feletti betegeknél a korral arányosan növelték a küszöbértéket, az életkort szorozták meg 10-zel. Arra a következtetésre jutottak, hogy az életkorral korrigált D-dimer küszöbérték, szemben a konvencionális 500 µg/L fibrinogén ekvivalens egység (FEU) értékkel, diagnosztikai értéke nagyobb, nagyobb számú (egyébként alacsony kockázatú) betegnél lehetett biztonsággal kizárni a tüdőembóliát (Douma és mtsai., 2010; Righini és mtsai., 2014). Számos későbbi tanulmányban is előnyösnek találták a D-dimer küszöbérték korszpecifikus változtatását (Ackerly és mtsai., 2018; Dutton és mtsai., 2018; Jaconelli és mtsai., 2018; Nybo és Hvas, 2017; Parry és mtsai., 2018; Sheele és mtsai., 2018).

Favresse és munkatársai (2018) szerint ma már általánosan ajánlott a korszpecifikus küszöbérték alkalmazása. Ennek ellenére egy nemzetközi felmérésben arról számoltak be, hogy az ajánlott korszpecifikus küszöbérték használata nem terjedt el széles körben, csupán a laboratóriumok kevesebb, mint 10%-a alkalmazza ezt a megközelítést (Favresse és mtsai., 2018; Lippi és mtsai., 2015).

A specifikus küszöbértékek használatát már gyermekek és terhes nők estén is javasolták. Ugyanakkor, mivel a D-dimer koncentráció a terhesség alatt fiziológiásan emelkedik, a pontos D-dimer küszöbérték meghatározása nagy kihívást jelenthet (Szecsi és mtsai., 2010).

A fenteikben ismertetett tényezők a D-dimer tesztek standardizálását nehezítik, vagy csaknem lehetlenné teszik.

Az általánosan ismert tényezők összefoglalva:

- a D-dimer nem egységes, egyetlen molekulatömeggel definiálható molekula, a keresztkötött fibrin plasminnal történő emésztése során heterogén D-dimer fragmentumok keletkeznek (Reber és Moerloose, 2013),
- a tesztekben használt monoklonális ellenanyagok eltérő antigénspecifitással rendelkeznek (Adam és mtsai., 2009; Longstaff és mtsai., 2016),
- hiányzik egy nemzetközileg elfogadott belső kontroll, és/vagy kalibrátor anyag, amelyekhez a teszteket igazítani lehetne,
- különböző interpretációs megközelítést (abszolút D-dimer koncentráció, illetve FEU koncentráció, amely a dimerizációt hivatott figyelmbe venni),
- különböző mértékegységeket (ng/ml, mg/ml, ng/dl mg/dl stb.),

- illetve klinikai küszöbértékeket alkalmaznak
- a D-dimer próba nem küszöböli ki a heterofil immunreakciókat

Mivel a D-dimer tesztek standardizálása eddig sikertelen volt, a nemzetközi ajánlásokban a tesztek harmonizálására törekednek. (Dempfle, 2006; Stegnar és Bozic, 2008). Mullier és munkatársai (2014) öt különböző D-dimer tesztet hasonlítottak össze, a vizsgálati eredmények közti különbségek csökkentésére a küszöbértékeket változtatták meg, figyelembe véve a betegek életkorát.

A legtöbb esetben matematikai modellek alkalmazásával kísérelték meg a különböző próbák által kiadott eredmények összehangolását (Dempfle és mtsai., 2001; Jennings és mtsai., 2007; Meijer és mtsai., 2006).

Nieuwenhuizen (1997) az elsők között foglalkozott a D-dimer tesztek harmonizálásával. Különböző betegségekben szenvedő emberek vérplazma mintáit öntötte össze, többféle mintakeveréket hozva létre, melyeket öt különböző D-dimer tesztel mért le. Az egyes tesztek által kiadott D-dimer értékek átlaga alapján minden keverékhez hozzárendelt egy konszenzus értéket, mellyel később az adott próba által kiadott eredményt korrigálta. A korrelációs vizsgálatok során kapott regressziós koefficiens értékek 0,7-0,92-ig terjedtek, mely eredmény arra enged következtetni, hogy egy konverziós faktor használata megfelelő megközelítés lehet a különböző tesztek által adott eredmények harmonizálására.

Dempfle és mtsai. (2001) hasonlóképpen matematikai módszert használtak a kísérleteikben és konverziós faktor számolásával érték el, hogy a vizsgálataikba bevont 23 különböző D-dimer teszt közötti korrelációt növelni, javítani tudták.

Bár a fent említett megközelítések azt mutatják, hogy a harmonizációra van esély, de ehhez ezeket a módszereket széles körben alkalmazni kellene. Ehhez a jelenlegi módszerek további tesztekre való kiterjesztésére volna szükség (Favresse és mtsai., 2018). A Nemzetközi Thrombosis és Haemostasis Társaság (ISTH) fibrinolysis és DIC standardizációval foglalkozó albizottsága is felhívást intézett a D-dimer tesztek harmonizációs problémájának megoldására (Longstaff és mtsai., 2016).

### **3.2.5 Diagnosztikai próbákat jellemző mutatók**

A diagnosztikai próbák jellemzésekor többféle paramétert is vizsgálhatunk. Ezek közül legjellemzőbbek a próba egy adott betegségre megállapított szenzitivitás és specificitás



értékei, a negatív és pozitív prediktív értékek, továbbá a vevő működési karakterisztika görbe (ROC) analízis.

Alapvetően a próbák diagnosztikai értékét a szenzitivitás és specificitás értékek meghatározásával lehet megadni (Zweig és Campbell, 1993). Mindezek megállapításához a vizsgált betegségben szenvedők, illetve az egészségesek csoportjaiban is elvégzik az adott próbát, melynek eredménye alapján pozitívnak, vagy negatívnak minősítik őket. A próba által adott pozitív/negatív eredmények és a más módszerekkel bizonyítottan betegek, illetve egészséges egyedek eredményeinek összevetése alapján négyféle kategóriát állapítanak meg, melyek az alábbiak:

- valós pozitív teszt (TP= true positive),
- valós negatív teszt (TN= true negative),
- tévesen pozitív teszt (FP= false positive),
- tévesen negatív teszt (FN= false negative).

Mindezek alapján a diagnosztikai szenzitivitás annak a valószínűsége, hogy a próba értéke pozitív lesz azoknál a személynél, akinél a betegség valóban fennáll:  $TP/(TP+FN)$ .

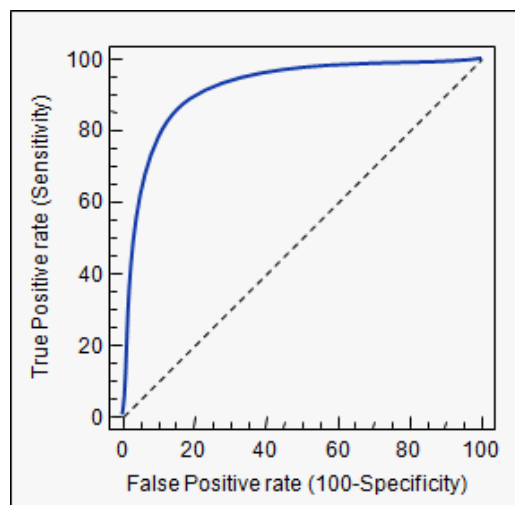
A diagnosztikai specificitás ezzel szemben azt jellemzi, hogy a próba mekkora biztonsággal azonosítja az egészséges egyedeket:  $TN/(TN+FP)$ .

Egy ideális diagnosztikai próba eredményei nem mutatnának átfedést a betegek és egészségesek csoportjai között, illetve szenzitivitás és specificitás értékeként is 100%-ot kellene adnia. Azonban a valóságban számos diagnosztikai próba eredményeinek eloszlásában átfedést láthatunk a betegek és az egészségesek eredményei között.

Ha a diagnosztikai küszöbértéket változtatjuk, jelentősen befolyásoljuk a szenzitivitás és specificitás értékek alakulását is. Alacsonyabb döntési szintet választva nő az érzékenység, mivel a hamis negatív eredmények száma csökken, ellenben a hamis pozitívaké növekszik. Növelve a küszöbértéket nagyobb specificitást érünk el, ugyanis ez több hamis negatív, és kevesebb hamis pozitív esetet eredményez (Fazekasné Kis, 2002).

Az ROC görbe analízis a diagnosztikai próbák hatékonyságának elemzésére és szemléltetésére alkalmazott módszer, mely hasznos lehet különböző próbák hatékonyságának összehasonlítására is. Az ROC görbével ábrázolható az adott próba eredményeinek átfedése a betegek és az egészségesek csoportjainak adataiból, az egyes

küszöbértékek mentén. A görbe minden pontja egy szenzitivitási és specificitási pontpárt jelenít meg egy adott küszöbértéknél. A görbét egységnyezetben ábrázolva, az x-tengelyén az (1-specificitás), y tengelyén pedig a szenzitivitás értékeket tüntetik fel. A próba hatékonysága annál jobb, minél inkább a maximális felé közelítenek a szenzitivitás és specificitás értékek, ez az ROC görbén úgy jelenik meg, hogy a görbe az egységnyezet bal felső sarkához közelít. A próba hatékonysága kifejezhető a görbe alatti terület mérőszámával is. Idealizált esetben ez a szám maximális, vagyis = 1, ami azt jelenti, hogy a teszt a betegek és az egészségesek eredményeit tökéletesen jól szétválasztja, megkülönbözteti egymástól. Viszont a legtöbb diagnosztikai próba esetében az eredmények eloszlásában valamilyen szintű átfedést tapasztalhatunk a betegek és az egészségesek csoportjában (3. ábra).



**3. ábra** Egy diagnosztikai próba adott betegségre vonatkoztatott ROC görbéjének ábrázolása

Figyelembe véve adott diagnosztikai próba felhasználási célját, akkor érdemes nagy szenzitivitású tesztet alkalmazni, amennyiben minden beteget azonosítani akarunk. Hasonlóképpen akkor is egy nagy szenzitivitású tesztet érdemes előnyben részesíteni, mikor a teszteredmény alapján egy betegség kizárása a fő cél (Lásd: D-dimer próba), mivel ez esetben nagy valószínűséggel pozitív eredményt kapunk a betegség fennállása esetén.

Míg a szenzitivitás és specificitás a vizsgált próba megbízhatóságáról informál, addig a pozitív és negatív prediktív érték az egyén szempontjait is figyelembe veszi. A negatív prediktív érték (NPV), annak a valószínűsége, hogy egy negatív eredmény esetén a vizsgált egyén nem beteg. A pozitív prediktív érték (PPV) pedig annak a valószínűsége, hogy pozitív eredmény esetén valóban fennáll a betegség. Meghatározásuk az alábbi számítások alapján történik (Miseta, 2003):

$$NPV = TN / (FN + TN)$$

$$PPV = TP / (FP + TP).$$

### **3.2.6 A VTE betegség leírása, előfordulása**

A vénás thromboemboliás betegségek súlyos és akár életveszélyes következményekkel is járó megbetegedések. Legelterjedtebb formái, a mélyvénás thrombosis és a tüdőembólia. A mélyvénás thrombosis legtöbbször az alsó végtagok mélyvénáiban alakul ki, akadályozva a vér áramlását, ezáltal duzzanatot, fájdalmat idézve elő. Komolyabb veszélyt az jelent, ha a vérrögök kisebb – nagyobb darabok leszakadnak, melyek a vérárammal a szíven keresztül a tüdőbe jutnak, tüdőembóliát okozva. Ha az embolus egy kisebb tüdőartériát zár el, az érterületben véres beszűrődés lép fel, mely megtölti az alveolusokat, és tüdőinfarktust eredményez. Abban az esetben, amikor időről – időre több, kisebb embólus kerül a tüdőbe, krónikus multiplex microembolisatio lép fel. A legsúlyosabb szövődményt az jelenti, ha egy kellően nagy méretű embólus az arteria pulmonalist, vagy annak valamely főágát zárja el, mely következtében súlyos sokk léphet fel és azonnali halált okozhat (Magyar és Petrányi, 1974).

A VTE évente átlagosan a populáció egy ezredét érinti, viszont növekvő előfordulás tapasztalható az idősebb, 75 év feletti korosztályban. Az ő esetükben 100 emberből 1-nél jelentkezik a betegség. Egy kimutatás szerint az előfordulási valószínűség csökkenést mutat a populáció fiatalabb rétegeiben, ahol a VTE megközelítőleg 10000 emberből 1-nél fordul elő az egészséges, 15 és 49 év közötti női populációt vizsgálva (Vandenbroucke és mtsai., 2001).

### **3.2.7 A VTE diagnosztizálása D-dimer koncentráció meghatározással és képalkotó módszerekkel**

A VTE diagnosztizálásához a jellegzetes tünetek, klinikai adatok jó iránymutatóknak számítanak, de a vénás thromboemboliás betegségek diagnózisát nem lehet kizárólag a klinikai értékelésre alapozni, ugyanis a klinikai jelek és tünetek a DVT és a PE esetében sem kellőképpen specifikusak. Annak ellenére, hogy a klinikai adatok ismeretében biztos diagnózis nem adható, mégis nagy segítséget jelentenek abban, hogy a klinikusok különböző kategóriákba sorolhassák a betegeket a VTE valószínűségének szempontjából. A klinikai valószínűségek megítélését predikciós pontozási rendszerek alapján végzik (Wells és Geneva pontrendszerek), melyek szerint kis, közepes és nagy valószínűségi csoportokba oszthatóak a vizsgált betegek (Ten Cate-Hoek és Prins, 2005; Wells, 2007; Wells és mtsai.,

2000). Ha ezt az értékelési rendszert a D-dimer próbával kombináljuk, már megbízható következtetésekre juthatunk. Amennyiben egy kvantitatív és egyben kellően magas NPV-vel rendelkező D-dimer teszttel mért negatív eredményhez (küszöbérték alatti eredmény), kis- vagy közepes klinikai valószínűség párosul, akkor erős bizonyossággal zárható ki a VTE. Abban az esetben viszont, hogyha a betegnél a pontrendszer alapján nagy valószínűséggel van jelen a VTE, akkor a D-dimer próba elvégzése kevésbé informatív, kizárásra ebben az esetben nem alkalmazható, csak támogathatja a diagnózist (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).

Több, mint ezer beteg eredményét elemző tanulmányban többféle – ELISA- módszeren, illetve latex immunturbidimetrián alapuló D-dimer próbát vetettek össze, és a tüdőembóliát kizáró szerepüket vizsgálták. Összesített eredmények alapján, az ELISA próbák specificitása átlagosan 45%, szenzitivitásuk 95%, a latex turbidimetriás teszteké pedig 51% és 93% volt. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy mindkét módszeren alapuló próba alkalmas a tüdőembólia kizárására, a Wells és a Geneva pontrendszer szerint kis- vagy közepes valószínűségi értékek figyelembe vétele mellett (Segal és mtsai., 2007). Egy másik tanulmányban, Stein és munkatársai (2004) közel 80 VTE-gyanús betegenkülönböző típusú D-dimer tesztekkel végzett vizsgálatokat elemeztek. Összességében a legérzékenyebbnek az ELISA és kvantitatív rapid ELISA próbák bizonyultak, az DVT esetében ez 96%-ot, míg a PE-nél 97% szenzitivitási értéket jelentett. Az érzékenység alapján megállapított NPV ezeknél a próbáknál kellően magas, így alkalmasnak tekinthetők önmagukban is a VTE kizárására (Pinczés és Speer, 2009; Stein és mtsai., 2004).

A D-dimer próba kis specificitása miatt a betegség fennállását nem lehet csak a pozitív D-dimer eredményre alapozni. Mivel számos más betegség és állapot hatására is megemelkedhet a D-dimer koncentrációja a vérben, ezért a pozitív vizsgálati eredményt nem tekinthetjük a VTE igazolásának, ebben az esetben csak a további képalkotó diagnosztikai vizsgálatok indikációjára szolgál.

A mélyvénás thrombosis gyanúja esetén, képalkotó vizsgálatként elsősorban az alsó végtagi mélyvénák Doppler-ultrahangos vizsgálatát, szükség estén izotópvizsgálatot végeznek. A tüdőembólia igazolására a ventillációs/perfúziós tüdőszcintigráfia alkalmas, valamint indokolt esetben pulmonális angiográfia, vagy spiral computer tomographia (CT) segít a diagnózis felállításában (Michiels és mtsai., 2003).

### **3.2.8 Disseminált intravasculáris coagulatio diagnosztizálása**

A DIC rendszerint hirtelen fellépő, súlyos, az életet is veszélyeztető állapot, melyet a hemostatikus rendszer tartós aktivációja jellemez. Ennek során intravasculáris thrombingeneráció, fibrinképződés lép fel, azaz vérrögök képződnek a véráramban, amelyek elzárják a vékonyabb ereket, és elhasználják a véralvadáshoz szükséges faktorokat. Az állapot rendszerint kiterjedt alvadással kezdődik, majd ahogy az alvadási faktorok jelenléte csökken a véráramban, súlyos vérzés lép fel. A fokozott alvadás fokozott fibrinolysissel is jár (Favresse és mtsai., 2018; Kelly és Schindler, 1998).

A diagnózis felállításához több paraméter együttes ismerete szükséges. Jellemző a vérben hirtelen lecsökkent vérlemezkeszám, és a megnyúlt alvadási idő. A D-dimer és egyben a fibrin degradációs termékek emelkedett koncentrációja, illetve az alvadási faktorok csökkenése is nagyban hozzájárul a diagnózis megerősítéséhez. Viszont hasonlóképpen a mélyvénás thrombosishoz és tüdőembóliához, kizárólag a pozitív D-dimer eredmény alapján nem állítható fel a DIC diagnózisa, mivel a D-dimer értéke számos más klinikai állapot esetén is megemelkedhet. A betegség kezelése szempontjából kiemelkedően fontos a korai diagnózis megállapítása, illetve a kiváltó ok feltárása, és megszüntetése. Ezen okok lehetnek: fertőzés, trauma, rosszindulatú daganat, immunológiai rendellenesség, szülészeti betegségek, toxinok jelenléte, vagy gyulladásos betegségek (Wada és mtsai., 2014).

### **3.3 A D-dimer vizsgálat diagnosztikai jelentősége az állatgyógyászatban**

A D-dimer érték meghatározása állatorvosi szempontból is jelentős, ugyanis a hipercoagulációs, fokozott véralvadással járó állapotok az állatokban is emelkedett D-dimer koncentrációt eredményeznek, amelynek diagnosztikai értékével több tanulmányban is foglalkoztak, elsősorban a kutyák, de a lovak, és a macskák esetében is.

El-Zahar és munkatársai (2018) szerint a súlyos kólikában szenvedő lovaknál az emelkedett D-dimer koncentráció egy fontos diagnosztikai paraméter, mely egyben a DIC jelenlétére is utal. Egyes vizsgálatokban a magas D-dimer érték negatív prognosztikai mutatónak bizonyult a kólikás megbetegedés kimenetelére nézve (Cesarini és mtsai., 2010; Sandholm és mtsai., 1995).

Macskák esetében is, ugyancsak a DIC-el kapcsolatban tapasztaltak emelkedett D-dimer értékeket (Tholen és mtsai., 2009). Más betegségeknél is felléphet fokozott coagulatio, melyeknél magasabb D-dimer koncentrációról számoltak be. Ebben a sorban kell említenünk

a macskák fertőző hashártyagyulladását (Hartmann, 2005), valamint a macskák gyakori szívelégtelenségét, a hypertrophiás cardiomyopathiat (Bedard és mtsai., 2007; Brazzell és Borjesson, 2007; Kim, 2014; Stokol és mtsai., 2008).

### **3.3.1 D-dimer koncentráció vizsgálata kutyák egyes megbetegedéseinél**

Kutyák esetében a D-dimer koncentráció vizsgálatának elsősorban a tüdőembólia és a DIC meghatározásában van jelentősége, de a thromboemboliás betegségeken kívül számos más kórkép – vérzés, vese, szív- és máj elégtelenség, műtét utáni állapotok és a daganatos megbetegedések – esetén is emelkedett lehet az értéke (Giannouloupolos és mtsai., 2010; Stokol, 2003). Emiatt a D-dimer értéknek még magas szintű emelkedése sem teszi lehetővé a pontos diagnózis felállítását. Epstein és munkatársai (2013) a D-dimer koncentráció diagnosztikai jelentőségét vizsgálva a tüdőembóliában szenvedő kutyáknál azt tapasztalták, hogy 250 ng/ml-es (0,5 µg/ml FEU) küszöbértéket alkalmazva nagy biztonsággal kizárható volt a tüdőembólia. Ugyanakkor az emelkedett D-dimer koncentráció mérésével nem lehetett a betegséget specifikusan megállapítani, a tüdőembólia meglétét bizonyítani. Tick és mtsai. (2008) vizsgálataik során arra a következtetésre jutottak, hogy a magas D-dimer érték jelentős összefüggést mutatott a tüdőembólia fennállásával. Egy másik tanulmányban Nelson és Andreasen (2003) egészséges és tüdőemboliás kutyákat vizsgáltak. Az egészséges kontroll csoport esetében 250 ng/ml (0,5 µg/ml FEU) D-dimer koncentráció alatti, ugyanakkor a tüdőemboliás, beteg kutyák csoportjánál igen magas, 2000 ng/ml (4 µg/ml FEU) feletti értékeket mértek.

Egy másik, a kutyákat érintő súlyos thromboemboliás és vérzéses megbetegedés a DIC, mely mindig valamilyen más betegség következménye, mint például a neoplasia, fertőzés, hasnyálmirigy gyulladás (pancreatitis), szívinfarktus vagy az immun-közvetített hemolitikus anémia (IMHA) (Stokol és mtsai., 2000). A DIC diagnosztizálása is meglehetősen nehéz, mivel csak több klinikai és laboratóriumi vizsgálat eredményének összegzésével állítható fel a helyes diagnózis (Giannouloupolos és mtsai., 2010). Stokol 20 DIC-ben szenvedő és 30 egészséges kutyát vizsgált, és a D-dimer értékeket latex agglutinációs és immunturbidimetriás próbákkal mérte. Vizsgálatai során azt találta, hogy a DIC-ben szenvedő kutyák esetében magasabb volt a D-dimer koncentrációjának átlagértéke, mint az egészséges kutyák csoportjában (Stokol és mtsai., 2000).

A D-dimer koncentráció vizsgálatának jelentőségéről a DIC-ben szenvedő kutyák esetében több közlemény is beszámol (Caldin és mtsai., 2000; Griffin és mtsai., 2003; Machida és

mtsai., 2010). A vizsgálati eredményeik alapján a D-dimert a DIC egyik fontos, alkalmazható diagnosztikai markerének vélik.

### **3.3.2 A D-dimer tumormarker szerepe human- és állatgyógyászati vonatkozásban**

A szakirodalomban számos közleményt találunk, amelyek humán klinikai vizsgálatokra alapozva arról számolnak be, hogy a D-dimer emelkedett koncentrációja és a szervezetben lévő tumor összefüggésben állhat, és ezáltal a D-dimer potenciális prognosztikus markerként használható (Nagy és mtsai., 2012). Különböző daganattípusokat vizsgáltak és összefüggést találtak az emelkedett D-dimer érték és a tüdő (Altiay és mtsai., 2007; Gabazza és mtsai., 1993), az emlő (Blackwell és mtsai., 2000; Dirix és mtsai., 2002; Khan és mtsai., 2007), a mozgásszervi (Morii és mtsai., 2008), a prosztatata (Adamson és mtsai., 1993; Khoury és mtsai., 2010; Nakashima és mtsai., 1995) a nyaki (Gadducci és mtsai., 1993), valamint a vastagbél daganatokkal (Kilic és mtsai., 2008) diagnosztizált betegek esetében. Ugyanakkor az állatorvosi szakirodalomban mindössze csak néhány közlemény számol be arról, hogy daganattal diagnosztizált kutyák esetében is vizsgálták a D-dimer értéket, és összefüggést találtak a daganat és az emelkedett D-dimer érték között. Andreasen és munkatársai (2012) a coagulatiót és a fibrinolysist jellemző paramétereket vizsgálták 71 malignus tumort hordozó beteg kutyánál, és a hemostatikus paraméterek változásait vetették össze a daganat típusával, és a kórfolyamat előrehaladott állapotával. A D-dimerre vonatkozólag azt találták, hogy azoknál a kutyáknál, melyeknél távoli áttétet állapítottak meg, szignifikánsan emelkedett a fibrinogén és a D-dimer érték is, szemben a helyi invazív vagy nem-invazív tumorokkal (Andreasen és mtsai., 2012). Egy másik tanulmányban a D-dimer koncentrációt és a thrombocyta számot vizsgálták egészséges, illetve különböző betegségekben szenvedő kutyáknál. Hatféle betegcsoportot alakítottak ki, melyek között a neoplasiás kutyák csoportja (n=28) volt az egyik. Kimutatták, hogy a D-dimer koncentráció ebben a csoportban is jelentősen emelkedett volt (Kang és mtsai., 2016).

### **3.3.3 D-dimer tesztek validálása kutyáktól származó minták vizsgálata céljából**

A szakirodalom adatai szerint a legtöbb esetben az állatok D-dimer értékét az emberi vérplazma minták vizsgálata céljából előállított D-dimer tesztekkel (anti-human D-dimer monoklonális ellenanyagokkal) mérték. Az ilyen tesztek a kutya minták vizsgálatára alkalmassá téve validálták (Giannouloupolos és mtsai., 2010), az ebekhez igazított küszöbértéket rendelve a teszthez.

A kereskedelmi forgalomban korábban elérhető volt, egy kifejezetten a kutyák D-dimer koncentrációjának mérésére kifejlesztett kvalitatív immunkromatográfiás diagnosztikai teszt, az AGEN Canine D-dimer teszt (Vedco, St. Joseph, MO), amelyet a gyártó a DIC-ben szenvedő kutyák diagnosztizálására ajánlott. Griffin és mtsai. egy 2003-as tanulmányában különböző betegségekben (DIC, thromboembolia, hemorrhagia) szenvedő kutyákat vizsgált ezzel a kutya-specifikus D-dimer teszttel (Griffin és mtsai., 2003). Azóta ez a teszt már nem érhető el, nem forgalmazzák (Giannouloupoulos és mtsai., 2010). Tudomásunk szerint jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban olyan D-dimer diagnosztikai teszt, amelyet specifikusan a kutya vérplazma minták vizsgálatára ajánlanának. Ugyanakkor számos humán plazma D-dimer vizsgálatára használt diagnosztikai próbát találtak alkalmasnak kutya minták vizsgálatára. A mérési mód szerint ezek között vannak immunturbidimetriás próbák, pl. Tina-quant D-dimer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország) (Caldin és mtsai., 2000; Stokol és mtsai., 2000), latex agglutinációs próbák, Accuclot D-dimer (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) (Nelson és mtsai., 2009; Stokol és mtsai., 2000), valamint immunometrikus Nyco Card „point-of care” teszt (AXIS-SHEILD PoC AS, Oslo, Norvégia) (Dewhurst és mtsai., 2008).

### **3.4 A D-dimer próbákban alkalmazott ellenanyagok ismertetése**

#### **3.4.1 Szerkezeti felépítés**

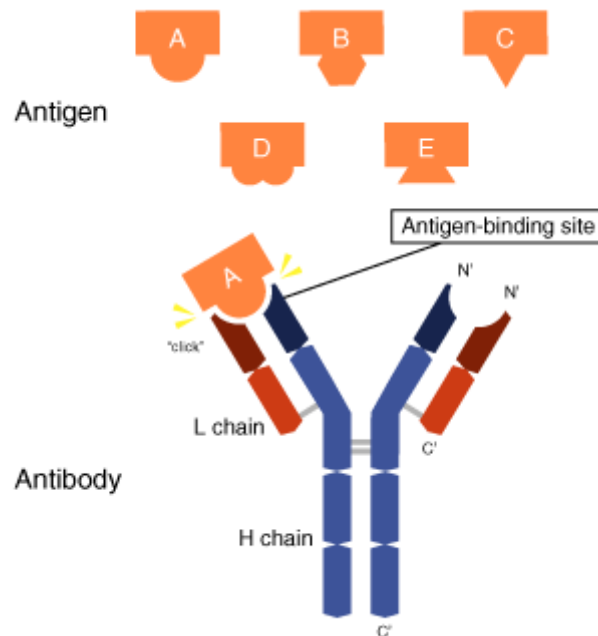
Az ellenanyagok az immunglobulinok közé tartozó, specifikus felismerő molekulák. Az ellenanyagok keletkezését kiváltó, azok által felismert és velük kölcsönhatásba lépő anyagokat antigénnek nevezzük. Az ellenanyag az antigénen lévő adott epitópot ismer fel. Az ellenanyagok a szervezetben a vérben, szöveti folyadékban, váladékokban fordulhatnak elő, a memória immunválasz részeként, az immunrendszer B-sejtjeiből származó klónok termelik.

Az immunizálást követően a vérben megjelenő IgM ellenanyagokat IgG váltja fel, illetve az immunválasz előrehaladtával, vagy többszöri antigéninger hatására egyre hatékonyabb ellenanyagok keletkeznek, ezáltal az immunválasz gyorsabb és hatékonyabb lesz.

A komplex antigén poliklonális immunválaszt vált ki, ami eltérő specificitású ellenanyagok termelődéséhez vezet, melyek az adott antigén különböző epitópjait ismerik fel. A monoklonális ellenanyagok ezzel szemben egyetlen B-sejt klón termékei, így azonos specificitásúak, az antigénen egyetlen epitóppal reagálnak.



Az ellenanyag térszerkezete Y-hoz hasonlít, felépítésük szerint szimmetrikusak, négy polipeptidláncból álló egységet alkotnak: két-két egyforma könnyű és nehéz láncból állnak. Egy könnyűláncot diszulfid hiddal egy nehéz lánc kapcsolódik, a két nehéz lánc pedig egymáshoz szintén diszulfid hidakkal kapcsolódik (4. ábra).



**4. ábra** Az ellenanyag szerkezete, antigénfelismerés

*Forrás: www.mblbio.com*

*Megjegyzés: Antigen-binding site: Antigén-kötő oldal; L chain: Könnyű lánc; H chain: Nehéz lánc.*

Ha a nehéz láncokat a kapocsrégió környékén papainnal elhasítják, a molekula Fc és két Fab részre esik szét. Ez utóbbi részen található az antigénkötő hely. A human immunglobulinok nehézláncuk szerint 5 izotípusba sorolhatók: IgA, IgD, IgE, IgG és az IgM, melyek funkcionalitásukban és szerkezetükben is mutatnak különbségeket. A könnyűláncoknak két típusa van:  $\lambda$  és  $\kappa$ . Az ellenanyagok nagy része (75%) az IgG osztályba tartozik, melyeknek jelentős része a másodlagos immunválasz során képződő ellenanyag. Az IgG osztály további négy alosztályra osztható fel, melyek az IgG1, IgG2, IgG3 és az IgG4 alosztályok (Gergely és Erdei, 2000).

### 3.4.2 Monoklonális ellenanyagok

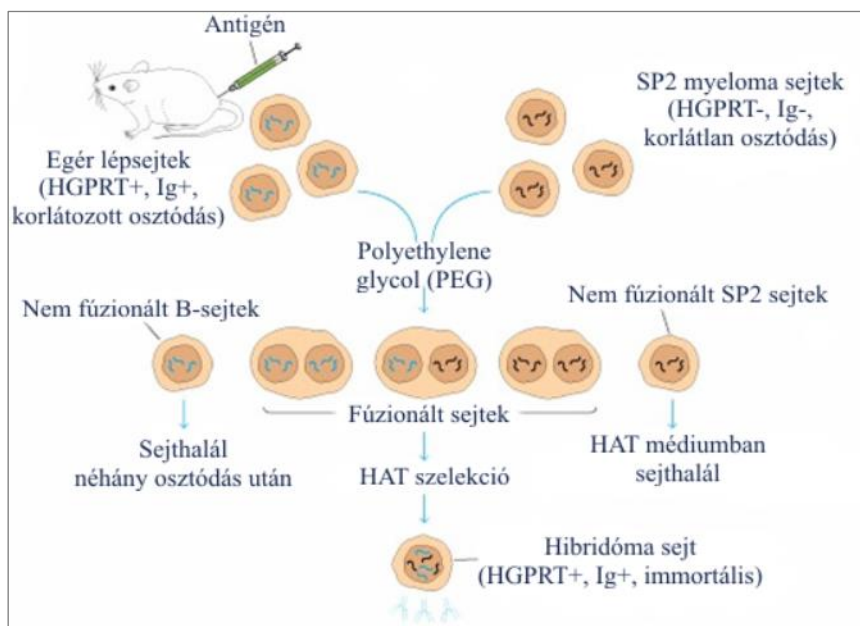
A monoklonális ellenanyagok olyan immunfehérjék, melyeket egyetlen B-lymphocytából származó sejtvonal sejtjei termelnek, így azonos specificitásúak, az antigénen egyetlen epitóp felismerésére képesek. Az ellenanyagot termelő sejtvonal hibridóma sejtjei a B-lymphocytá és myeloma sejtek fúziójával, hibridóma technikával állíthatók elő.

#### A monoklonális ellenanyag előállításának története

Jerrold Schwaber, 1973-ban írta le először a monoklonális ellenanyagok előállítását human és egér hibrid sejtek alkalmazásával (Schwaber et Cohen, 1973). Két évvel később, 1975-ben, Georges Kohler és Cesar Milstein kidolgozták a hibridóma (szomatikus sejt-hibridizációs) módszert, mely munkájukért Nobel-díjat kaptak (Kohler és Milstein, 1975). A módszer lehetővé teszi, hogy a korlátozott élettartamú immunsejt, mely adott tulajdonságú ellenanyag termelésére képes, kontrolláltan szelektálható és korlátlan ideig fenntartható, szaporítható legyen (Erdei, 2006). Mivel a monoklonális ellenanyagok egy-egy kiválasztott klón termékei, így minden szempontból -mint például affinitás, fajlagosság- azonos molekulák. Az antigénnek ugyanazon epitópját ismerik fel, és kapcsolódnak hozzá (Little és mtsai., 2000).

#### Hibridóma technika elve

A monoklonális ellenanyagot termelő sejtvonalak előállítására használatos legelterjedtebb módszer a hibridóma technika, mely során első lépésként különböző állatokat – leggyakrabban egereket – immunizálnak egy adott antigénnel. Az ennek következtében fellépő immunválasz során az állat lépében található B-lymphocytá sejtek ellenanyagot kezdenek termelni a szervezetükbe került antigén, pontosabban az antigén felszínén lévő epitópok ellen. A következő lépésben a lépesejtből származó lymphocytákat korlátlan szaporodásra képes myeloma sejtekkel fuzionálják, amelyeknek génállományából hiányzik a hypoxantin-guanin-foszforiboziltranszferáz (HGPRT) gén, ezáltal képtelenek a nukleotid szintézisre. Ezután a sejt-fúzióval létrejött ún. hibridóma sejteket egy szelektív tápfolyadékban (hipoxantin, aminopterin, timidin (HAT) médium) *in vitro* kultiválják, mely a nukleotid szintézist gátló hipoxantin-aminopterintimidint tartalmaz (Little és mtsai., 2000). A szelektív tápfolyadékban így csak azok a hibridóma sejtek maradnak fenn, melyek a myeloma sejtek korlátlan szaporodó képességével és a B-lymphocyták szelektív rezisztenciájával (nukleotid szintézis képesség) is bírnak (5. ábra).



**5. ábra** Hibridóma sejt előállítása

*Forrás: Immunológiai és Biotechnológiai Intézet PTE KK előadás*

*Megjegyzés: HGPRT+/-: hypoxantin-guanin-foszforiboziltranszferáz gén megléte/hiánya; Ig+/-: Immunglobulin termelő gén megléte/hiánya; HAT: hipoxantin-aminopterin-timidin szelekciós médium*

A kezdeti hibridóma sejt kultúra még az ellenanyagok keverékét tartalmazza, a sejtek több B-lymphocita klónra vezethetők vissza, amelyek mindegyike egy-egy epitóp ellen termelt specifikus ellenanyagot szekretál a médiumba. Így az ellenanyagok ebben a stádiumban poliklonálisak, monoklonális ellenanyag előállításához a sejtek klónozására van szükség (Liu, 2014). Az egyes klónokat hígítással választják szét egymástól sejtenyésző lemezekre, oly módon, hogy minden vájlatba egy sejt kerül, majd a felnövekvő sejtcsoportok által termelt specifikus ellenanyag aktivitását tesztelik. A pozitív választ adó, ellenanyagtermelő sejtcsoportokat szeparálva felnevesztik, újraklónozzák, majd újra vizsgálják (Li és mtsai., 2010). Az így létrehozott sejtvonal által termelt ellenanyagok, egy klónból származó sejtek termékei, a monoklonális ellenanyagok.

### 3.5 Az ellenanyagok immobilizálása latex agglutinációs próbákban

Az utóbbi évtizedekben egyre elterjedtebben használják az immunológiai eljárásokon alapuló klinikai diagnosztikai módszereket, köszönhetően magas érzékenységüknek és specificitásuknak. A számos immunológiai vizsgálati módszer közül a latex részecskék

agglutinációján alapuló módszereket széles körben alkalmazzák az orvosi diagnosztikában, amellyel a folyékony mintákban az antigén kis mennyiségének kimutatására nyílik mód.

Ezen vizsgálatok előnye, hogy az eljárások egyszerűek, biztonságosan elvégezhetőek, rövid idő alatt juthatunk eredményhez. Az agglutinációs reakció magában foglalja a hordozó nanorészecskék (latexszemcsék) in vitro aggregációját.

Az aggregáció az ellenanyagok és antigének közötti specifikus reakció következtében jön létre, melyhez szükség van az egyik, – jelen esetben ellenanyag – latex szemcsén történő immobilizálására, míg az antigént a vizsgált minta tartalmazza. A minta és az ellenanyaggal borított latex szuszpenzió összekeverése során zajlik le az antigén-ellenanyag reakció, agglutinációt eredményezve (Molina-Bolivar és Galisteo-Gonzalez, 2005).

Az ellenanyagok latex szemcsén történő immobilizálásának egyik módja, hogy kovalensen kapcsolják a karboxilált latex szemcsék felületéhez. Ennek során a latex szemcsék felszínén lévő karboxil csoportokat vízdoldható 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimiddel (EDAC) aktiválják, a reakció során egy instabil, aktív köztestermék keletkezik (O-acil-izo-urea), amely könnyen hidrolizálódik. A köztestermék gyors hidrolízisének megakadályozására N-hidroxi-szulfoszukcinimidet (NHS) adnak a reakcióhoz, az így keletkező stabil NHS észter köztestermék lassítja a primer aminokkal fellépő reakciót, hatékonyabb fehérje felkötést tesz lehetővé (Wickramathilaka és Tao, 2019). Az ellenanyag az N-terminális végén lévő antigén kötő helyen kapcsolódik az aktivált köztestermékhez.

### **3.6 Célkitűzések**

1. A doktori munka elsődleges célja egy új D-dimer-specifikus monoklonális ellenanyag előállítása volt, amelyet latex-agglutináción alapuló immunturbidimetriás diagnosztikai próba előállításához kívántunk használni.
2. Ehhez célul tűztük ki az új ellenanyag széles körű immunológiai jellemzését, különös figyelmet fordítva az ellenanyag specificitását is jelentősen meghatározó keresztreakció vizsgálatokra, illetve a D-dimer antigéneken felismert epitóp meghatározására.
3. További célunk volt egy, a latex-agglutináción alapuló immunturbidimetriás D-dimer diagnosztikai teszt előállítása, mely során az ellenanyagot latex mikroszemcsék felületére rögzítjük.

4. Végző célként az ellenanyagra épült diagnosztikai teszt humán klinikai teljesítményének értékelését, illetve állatorvosi gyakorlati alkalmazását kívántuk vizsgálni.

## 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 Monoklonális ellenanyag előállítás

#### 4.1.1 D-dimer antigén preparálása

A D-dimer antigén előállításához, fibrin alvadékot hoztunk létre, olyan módon, hogy kalciumot és thrombint tartalmazó thrombin idő reagenst (Dia-TT, Diagon Kft., Budapest, Magyarország) adtunk humán plazmához, és 90 percig 37 °C-on inkubáltuk. A keletkezett alvadékot 16000 g-vel, 10 percig centrifugáltuk, majd 50 ml TSC pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1g/l NaN<sub>3</sub>; pH 7,4) inkubáltuk 37 °C-on, 16 órán keresztül. A nem koagulált anyagoktól a fibrint többszöri átmosással tisztítottuk meg. A fibrin polimert plasminnal (Calbiochem, San Diego, CA) emésztettük, az enzimet 2,5 µg/ml végkoncentrációban alkalmazva, melynek következtében degradációs termékek keletkeztek. Az emésztést 37 °C -on végeztük, az anyagok rázóinkubátorban történő folyamatos mozgatása mellett. Az alvadék felülúszóját begyűjtöttük és újra TSC puffert és enzimet adtunk a megmaradt alvadékhoz. Ezeket a lépéseket folyamatosan ismételtük, az alvadék teljes emésztéséig. Az emésztett fragmentumokat tartalmazó felülúszókat Sephadex G-25 oszlopon (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) tisztítottuk, és Amicon Ultra szűrőn (100000 molekulatömeg elválasztási érték) (Millipore, Billerica, MA) töményítettük. Az emésztés során keletkezett fibrin degradációs termékek molekulatömegét nátrium-dodecil-szulfát gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és Western blottal határoztuk meg. A termék funkcionális aktivitását ELISA módszerrel (Asserachrome D-dimer, Diagnostica Stago Inc., Parsippany, NJ) és D-dimer latex immunturbidimetriás próbával (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Németország) mértük.

#### 4.1.2 Immunizálás

A kísérletben 6 db, 8 hetes, nőstény, 18-20 grammos Balb/c AnN Crl BR egeret (Charles River, Wilmington, MA) használtunk. Valamennyi állatot szigorúan a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó útmutatójában foglalt ajánlásokkal összhangban tartottunk, illetve a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (MÁB) által jóváhagyott kísérleti munkaterv szerint kezeltünk.

Az immunizálás során 3-3 db egeret intraperitonealisan (i.p.), illetve subcutan (s.c.) oltottunk, 200 µl D-dimert és komplett Freund adjuvánst (CFA) (SigmaAldrich Co., St. Louis, MO)

tartalmazó keverékkel. Az oltóanyag szuszpenziók különböző mennyiségekben tartalmazták az 1 mg/ml koncentrációjú saját preparálású D-dimert (100, 50 és 25  $\mu$ l), melyeket fiziológias konyhasóoldattal 100  $\mu$ l-re egészítettünk ki, és ezzel megegyező térfogatú CFA-sal emulgeáltunk (lásd 1. sz. melléklet). Az első oltást követő 24. napon az egereket ugyanezen módokon (i.p. és s.c.) a fent említett mennyiségekkel újra oltottuk inkomplett Freund-adjuváns (IFA) (SigmaAldrich Co., St. Louis, MO) felhasználásával. Tíz nappal a második oltás után vért vettünk az egerek laterális farokvénájából, és az ellenanyagválasz szintjét saját fejlesztésű indirekt ELISA (l.d. 4.1.5. fejezet) módszerrel vizsgáltuk. Négy héttel a második immunizálást követően (és 3 nappal a fúzió előtt) a legmagasabb szintű ellenanyagválaszt adó egeret intravénásan újra oltottuk, 50  $\mu$ l térfogatú D-dimert és fiziológias sóoldatot 1:2 arányban tartalmazó szuszpenzióval (6. ábra).



**6. ábra** Laboratóriumi Balb/c egér i.p. oltása a D-dimer antigénnel történő immunizálás során

*Fotó: saját forrás*

#### **4.1.3 Sejtfúzió**

Három nappal az utolsó oltást követően az egér lépét steril körülmények között eltávolítottuk, majd szérum mentes RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) tápoldattal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) fecskendő segítségével kimostuk a lépesejteket a lépét körülvevő kötőszöveti tokból. A lépesejtek tripánkék festékkel (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) festettük meg, majd Bürker kamrában számoltuk meg a sejtkoncentrációt. Többszöri mosás és centrifugálás (300 x g/10 perc) után a sejttöledéket 40 ml savómentes RPM1640 tápoldatban (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) szuszpendáltuk fel, majd log fázisban lévő ( $3 \times 10^7$  sejt) (prekultivált) Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejteket adtunk a szuszpenzióhoz. A

sejtszuspenziót 37 °C -on centrifugáltuk (300 g/10 min.), a felülúszót elöntöttük, majd 1 ml polietilén-glikol (PEG) és dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) keveréket adtunk lassan, 3 percen keresztül csepegtetve a sejttöledékhez. A fúzió alatt a csövet folyamatosan mozgattuk. Ezt követően 10 ml RPMI-1640 tápoldatot adagoltunk lassan a sejtszuspenzióhoz, 1 ml-t pipetázva percenként. Ezt a lépést megismételtük 20 ml-nyi médiumot adagolva 5 percen keresztül a sejtekhez, majd óvatosan felszuszpendáltuk, és 8 percig centrifugáltuk 250 g-vel 37 °C -on. A sejtfúziós lépéseket követően a sejttöledéket 42 ml sterilre szűrt lipid-A oldatot (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban szuszpendáltuk fel. A sejtszuspenziót 6 db 96-lyukú mikrotitráló lemezre mértük szét, 75 µl-ként. A sejttenyésztő lemezek vájataiba előzetesen 1 csepp RPMI-1640 tápoldatot mértünk, mely 10% foetális borjúsavót (FCS) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) és egér peritoneumból kinyert makrofágokat tartalmazott. A fuzionált sejteket 5% CO<sub>2</sub> -ot biztosító inkubátorban, 37 °C -on hagytuk növekedni.

#### **4.1.4 Hibridóma szelekció**

Huszonegy órával a fúzió után a hibridómák szelektálására 1 csepp ún. HAT szelekciós tápoldatot mértünk a tenyésztőlemezek minden vájatóba, mely 10% FCS-t, és 10% HAT-keveréket (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékból állt. Egy héttel később a HAT médiumot HT médiumra cseréltük, mely összetételében abban különbözött az előzőtől, hogy aminopterint nem tartalmazott. Két héttel a fúziót követően a felnövekvő sejtek felülúszóit indirekt ELISA-próbával vizsgáltuk a D-dimer-specifikus ellenanyagot termelő hibridómák azonosítása céljából.

#### **4.1.5 Indirekt ELISA vizsgálat**

Az ELISA vizsgálatban az általunk preparált és az előzőekben ismertetett D-dimer antigént használtuk. Az antigén munkahígítását karbonát pufferben (pH 9,6) való titrálással állapítottuk meg, majd a vizsgálatokhoz 100 µl mennyiségben mértük az ELISA-lemez (Analyzer Kft., Budapest, Magyarország) vájataiba. Tizenhat órán át +4°C-on történő inkubálást követően mosó-hígító pufferrel (Diavet Kft., Budapest, Magyarország) háromszor mostuk a lemezeket, majd 100 µl mennyiségben mosó-hígító pufferrel 1:2-ben hígított sejtfelülúszókat mértünk a vájatokba. A lemezeket 60 percig inkubáltuk +37°C-on. Ezt követően háromszor mostuk mosó-hígító pufferrel, majd 100 µl foszfáttal pufferelt sóoldatot (PBS) és Tween 20-at tartalmazó pufferben 1:2500-ra hígított kecskében termelt, egér immunglobulin nehéz- és könnyűláncot felismerő, tormaperoxidázzal (HRP) jelölt ellenanyagot (anti-egér IgG (H+L)-HRP konjugátum) (Jackson Immuno Research Labs,



Inc. West Grove, PA) mértünk a vájatokba. Egy órás +37°C-on végzett inkubáció után, a lemezeket az előzőekhez hasonlóan ismét mostuk, majd az enzimaktivitást 100 µl TMB (tetra-metilén-benzidin) (Diavet Kft., Budapest, Magyarország) bemérésével tettük láthatóvá. Hat perces inkubálás után a reakciót 50 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal állítottuk le. Az abszorbencia értékeket 450 nm-es optikai szűrőt használva Fluostar Optima (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) leolvasóval mértük meg. A lemezeken negatív kontrollként 10% foetális borjúsavót tartalmazó RPMI-1640-et használtunk. A mintát akkor tekintettük pozitívnak, ha a negatív kontrollhoz viszonyítva 1,5-szeres optikai denzitás (OD) értéket mutatott.

#### **4.1.6 Klónozás**

Az ellenanyag titer alapján kiválasztott sejtcsoportokat 2-5 alkalommal klónoztuk végponthígítós módszerrel. A klónozás során kiválasztott sejteket Bürker kamrában megszámoltuk, majd a sejtszám alapján 10% FCS-t tartalmazó RPMI-1640 médiummal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) hígítottuk, úgy, hogy a 96 vájatos mikrotitráló lemezre csepegtetve, minden vájatba egy sejt kerüljön. A mikrotitráló lemezt mikroszkóppal vizsgáltuk minden másnap, és megjelöltük azokat a vájatosokat, melyekbe valóban egy sejt került, és abból alakult ki az osztódás során egy sejtcsoport.

Amikor a sejtcsoportok megközelítőleg a vájat  $\frac{3}{4}$ -ét benőtték, mintát vettünk a vájatos sejtfelülűszoiból és indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk az ellenanyag titerét. Azokból a vájatosokból, melyekben csak egy sejtcsoportot azonosítottunk és emellett pozitív ELISA eredményt adtak, a sejteket szuszpendálás után sejtenyésző edénybe vittük át és 37 °C-on 5%-os CO<sub>2</sub> inkubátorban szaporítottuk tovább. Ezeket a sejtcsoportokat újra klónoztuk, mindaddig, míg a vájatosokban talált monoklon sejtcsoportok mindegyike kimutatható koncentrációban termelt ellenanyagot, vagyis pozitív ELISA eredményt adott. Az így kapott klónozott sejtvonalak monoklon sejtvonalak, monoklonális ellenanyagot termelnek.

## **4.2 Immunológiai vizsgálatok, karakterizálás**

### **4.2.1 Ellenanyag izotípus vizsgálat**

A termelt ellenanyagok könnyű- és nehézlánc szerinti izotípusát „Mouse monoclonal antibody isotyping test kit” (AbDSerotec, Raleigh NC) gyorseszttel állapítottuk meg. A monoklonális ellenanyag mintákat 1 µg/ml végkoncentrációban mértük 1% BSA-t tartalmazó PBS pufferhez. A liofilizált reagenst tartalmazó csövekhez 150 µl frissen hígított ellenanyag mintát mértünk, majd 30 másodpercig szobahőmérsékleten inkubáltuk, vortexen felkevertük.

Ezután a tesztcsíkot beleállítottuk a csövekbe, majd 5-10 perc múlva leolvastuk az eredményt. A kontroll sáv elszíneződése után kék sáv jelent meg a megfelelő osztály/alosztály ablakban, a monoklonális ellenanyag nehéz- és könnyűlánc összetételét megjelenítve.

#### **4.2.2 Keresztreakciók vizsgálata**

Az előállított ellenanyagok lehetséges keresztreakcióit saját fejlesztésű indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Antigénként különböző fibrin degradációs termékeket, úgy, mint fibrin-D monomert, fibrin-E monomert, fibrin-X fragmentumot, fibrin-Y fragmentumot, és fibrinogén degradációs termékeket, mint fibrinogén-D monomert, fibrinogén-E monomert (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Németország) és fibrinogént (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) alkalmaztunk a D-dimer antigén mellett. Ezeket a termékeket karbonát pufferrel hígítottuk (pH=9.6) és 2,5 µg/ml-es koncentrációban használtuk. A vajatokba 100 µl hígított antigént mértünk, majd 4°C -on inkubáltuk 16 órán át. A lemezeket háromszor mostuk mosó-hígító pufferrel (Diavet Kft., Budapest, Magyarország), majd a hibridóma sejtek felülúszóját 1:10 hígításban a vajatokba mértük. Tíz százalék foetális borjúsavóval kiegészített RPMI-1640 tápoldatot (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) használtunk negatív kontrollként. Egy óras, 37°C -os inkubációt követően a lemezeket háromszor mostuk, majd 100 µl, mosó-hígító pufferrel 2500-szorosra hígított, kecskében termelt, tormaperoxidázzal (HRP) jelölt, nehéz- és könnyűláncot felismerő anti-egér IgG(H+L) konjugátumot (Jackson Immuno Research Labs Inc., West Grove, PA) mértünk a vajatokba. A lemezeket egy órán át inkubáltuk, majd a mosási lépések után 100 µl TMB szubsztrátot (Diavet Kft., Budapest, Magyarország) mértünk a vajatokba. Hat perc elteltével 50 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal állítottuk le a reakciót, az abszorbanciát 450 nm-es optikai szűrőt használva, FLUOstar Optima mikrolemez leolvasón (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) mértük meg. Az eredmények vizsgálata során a keresztreakciók intenzitását az optikai denzitások hányadosából számoltuk:  $OD_{\text{sejtfelülúszó}}/OD_{\text{negatív kontroll}}$ . Ennek alapján a keresztreakciók intenzitását a következő kategóriákban határoztuk meg: ráta <2 nincs reakció (-); 2 <ráta> 3 gyenge keresztreakció (+); 3 <ráta> 5 mérsékelt keresztreakció (++); 5 <ráta> 8 erős keresztreakció (+++); ráta >8 intenzív keresztreakció (++++).

#### **4.2.3 Az antigén molekulatömegének vizsgálata gélelektroforézissel**

A vizsgálandó D-dimer fehérjét 1:1 arányban elegyítettük Laemmli pufferrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), majd 5 percig inkubáltuk forrásban lévő vízben, a fehérjék denaturálása végett. A redukált minták esetében a puffert előzetesen 5% 2-

merkaptóetanollal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) egészítettük ki. A pufferrel kevert fehérje mintákat, 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ gradiens poliakrilamid gél (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) vájataiba mértük, majd 1,5 órán át, 150 V feszültséggel elektroforetizáltuk, MiniVE gélelektroforézis készülékben (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). A fehérjék molekulatömegük alapján váltak szét a gélben, melyeket Coomassie Brilliant kék (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) festékkel vizualizáltunk.

#### **4.2.4 Az antigén Western blot vizsgálata**

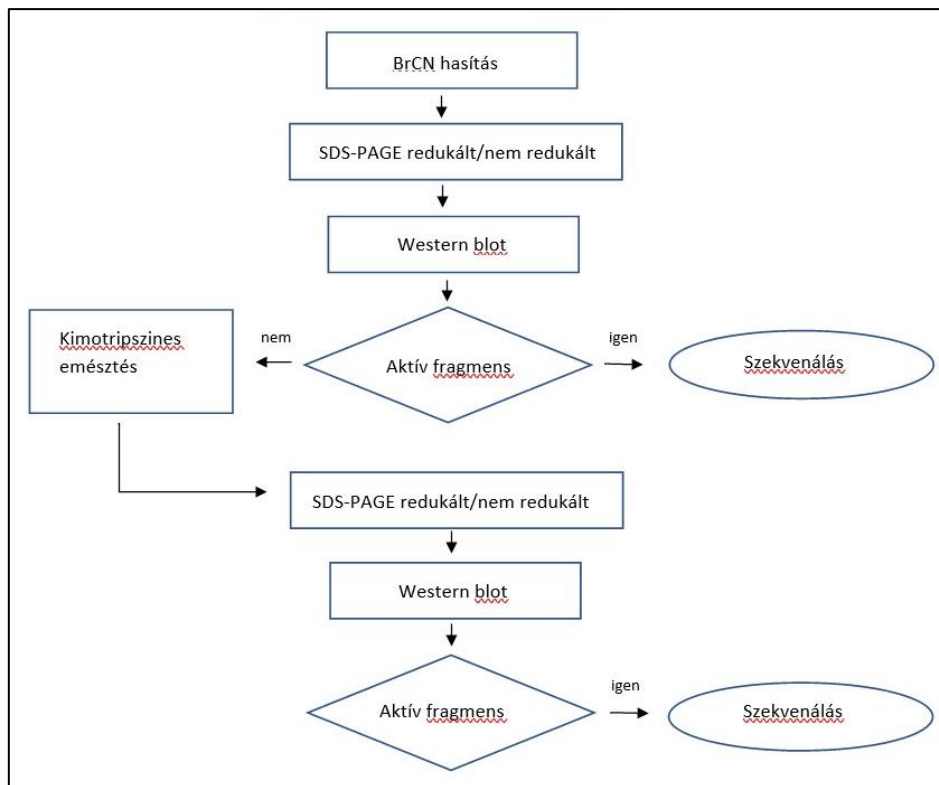
A Western blot analízishez előzetesen elvégeztük az antigén fehérje gélelektroforézissel történő szétválasztását, párhuzamosan, két gélt alkalmazva. Azt a gélt, melyet nem festettünk meg, egy ECL félszáraz blottoló készülékbe (Amersham Biosciences Co, Piscataway, NJ) helyeztük, és a gélen szétvált fehérjéket nitrocellulóz membránra (Merck Millipore, Billerica, MA) blottoltuk át. Az aspecifikus kötődés elkerülése végett a membránt 3,5% zsírszegény tejport tartalmazó PBS blokkoló oldatban áztattuk egy éjszakán át. Majd a membránt 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, PBS pufferrel 1000 x-re hígított, anti-D-dimer monoklonális ellenanyagot (2 mg/ml) (HyTest Ltd., Turku, Finnország) tartalmazó oldatban. A membránt PBST pufferben (PBS; 0,05% Tween-20) mostuk, majd egy órán át inkubáltuk kecskében termelt anti-egér IgG(H+L)-HRP konjugált ellenanyaggal (Jackson Immuno Research Labs. Inc., West Grove, PA), melyet 2500-szorosára hígítottunk PBS pufferrel. A további mosási lépések után a membránt 0,01% hidrogén-peroxidot tartalmazó 3,3'-diaminobenzidine (DAB) szubsztráttal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) festettük meg. Az antigén-ellenanyag reakció a kromogén reakció által vált láthatóvá, a megfelelő sávok barna színűre festődtek.

#### **4.2.5 Epitóp meghatározás**

Az antigén felszínén lévő, az ellenanyag által felismert epitóp meghatározáshoz enzimatikusan emésztett antigén fragmentumokat hoztunk létre. A fehérje antigéneket gélelektroforézissel szétválasztottuk, majd az általunk előállított monoklonális ellenanyaggal, Western blot módszerrel vizsgáltuk, végül megszekvenáltuk (7. ábra).

Az emésztett antigén előállításához, az immunizáláshoz is használt, preparált D-dimer fehérjét oldottuk 70%-os hangyasavban (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO), majd cianogén-bromiddal (CNBr) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) inkubáltuk. A CNBr emésztési folyamata 25 °C-on, argon gáz alatt, sötét helyen történt, 24 órán keresztül. A reakciót desztillált víz hozzáadásával állítottuk le. A visszamaradt CNBr-t liofilizálással távolítottuk el.

A liofilizált, emésztett fragmentumokat PBS pufferben oldottuk fel, majd SDS-PAGE-sel meghatároztuk a molekulatömegüket. A cianogén-bromiddal emésztett fragmentumokat tovább emésztettük kimotripszinnel (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO). A kimotripszinnel emésztett fragmentumokat ugyancsak gélelektroforézissel vizsgáltuk. Az antigén fragmentumokat Laemmli pufferrel kezeltük 1:1 arányban (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA), majd 5 percig inkubáltuk forrásban lévő vízben. A redukált minták készítése esetében a puffert 5% 2-mercaptoethanollal egészítettük ki. Az előkészített mintákat Clear PAGE 4-20%-os gél (C.B.S. Scientific Co. Inc., Del Mar, CA) vájataiba mértük, majd 110 V -on, 1,5 órán át futtattuk, Mini-Vertical Slab Gel/Blotting System DCX-700 (C.B.S. Scientific Co. Inc., Del Mar, CA) rendszerben. Az elektroforézis után a fehérjéket polivinilidén difluorid (PVDF) membránra (Merck Millipore, Billerica, MA) blottoltuk át, ECL Semi-dry Blotter (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) blottoló készülékkel. Az aspecifikus kötések elkerülése végett a membránt 3%-os sovány tejport (Merck Millipore, Billerica, MA) tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk egy éjszakán át. Majd a D-dimer specifikus 2B9 monoklonális ellenanyagot adtuk az oldathoz, mellyel 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránt. PBST pufferrel való mosás után a membránt tormaperoxidázzal konjugált kecskében termelt anti-egér IgG(H+L) (Jackson Immuno Research Labs., West Grove, PA) szekunder ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át, 2500-szoros hígításban. A PVDF membránra átblottolt fehérjék közül, az aktív fragmentumokat – melyek a D-dimer-specifikus 2B9 monoklonális ellenanyaggal reagáltak – Amersham ECL Western Blotting Detection reagenssel (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) tettük láthatóvá, Amersham Hyperfilm ECL -en (GE Healthcare, Uppsala, Svédország). A megfelelő fehérjecsíkokat kivágtuk a membránból, majd Edman protokollja (Edman, 1950) alapján szekvenáltuk, az ABI 494 fehérje szekvenátorral (Applied Biosystems, Foster City, CA).



7. ábra A D-dimer felszíni epitóp lokalizálásának menete

### 4.3 Monoklonális ellenanyag termeltetése

#### 4.3.1 Sejtbank létrehozása

A sejtbank létrehozásához a kiválasztott sejtvonalat előzetesen sejtenyészítő edényben tartottuk fenn, ehhez a kísérleti fázis során kétféle tápfolyadékot is alkalmaztunk (RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) és DMEM (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)). A különböző tápfolyadékokhoz szoktatott hibridóma sejtek, így elkülönülve kerültek a sejtbankba is, majd onnan felvéve az eltérő termelési rendszerekbe.

A hibridóma sejteket 5-5 db 182,5 cm<sup>2</sup> sejtenyészítő edényben szaporítottuk fel 5% FCS-t tartalmazó tápfolyadékban (RPMI-1640, illetve DMEM), 5%-os CO<sub>2</sub> inkubátorban, 37 °C-on. A sejteket steril fülke alatt szerológiai pipettával alaposan felszuszpendáltuk, hogy a sejtenyészítő edény faláról leváljanak, majd steril edénybe gyűjtöttük az edény tartalmát. A sejtuszpenzióból mintát véve a sejteket tripán kék (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) festékkel megfestettük, és az élő hibridóma sejteket Bürker kamrában megszámoztuk. A sejteket 300 g-vel 25 °C-on, 10 percig centrifugáltuk. A sejtüledéket előmelegített fagyasztó médiumban (20% FCS-t tartalmazó RPMI-1640/DMEM tápfolyadék) felvettük, és fagyasztócsövekbe 1 ml-ként szétmértük, úgy, hogy minden csőbe 1,5 x 10<sup>6</sup> - 3 x 10<sup>6</sup> db sejt

került. Mindegyik csőhöz 100 µl steril DMSO-t (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) mértünk, majd gyorskeverővel homogenizáltuk, és 1 órára  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóládába helyeztük, majd  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra tettük egy éjszakára. Másnap a csöveket folyékony nitrogén tárolóba,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra helyeztük át.

#### **4.3.2 Sejtek sejtbankból történő felszaporítása és fenntartása**

A folyékony nitrogénben tárolt sejtbankból  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben felolvasztottunk egy sejtszuspenziót tartalmazó fagyasztócsövet. A sejtszuspenzióhoz 35 ml FCS-mentes RPMI-1640 vagy DMEM tápoldatot mértünk, majd 300 g-n  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 10 percig centrifugáltuk. A leülepedet sejteket 2 ml 10% FCS-t tartalmazó tápfolyadékban felsuszpendáltuk, és egy  $25\text{ cm}^2$  tenyésztőfelületű sejtenyésző edénybe mértük. A tápfolyadékot 10 ml-re egészítettük ki. A sejtenyésző edényt  $\text{CO}_2$ -termosztátba helyeztük és  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$  tartalom mellett hagytuk a sejteket növekedni. Amikor sejtek elérték a 70-80%-os konfluenciát, a sejtszuspenziót a standard eljárásnak megfelelően, általában 2-3 naponta passzáltuk, illetve a szükséges méretű tenyésztőedényekbe szétosztottuk.

#### **4.3.3 Ellenanyag termelés miniPERM<sup>®</sup> bioreaktorban**

A monoklonális ellenanyag folyamatos termeltetését többféle rendszerben végeztük. Az egyik ilyen ellenanyag termeltetésre alkalmas rendszer a miniPERM<sup>®</sup> bioreaktor (Sarstedt, Nümbrecht, Németország). Ebben a termelési rendszerben a hibridóma sejteket 10% foetális borjúsavót, Antibiotic Antimycotic oldatot (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük.

A sejtenyésző edényekben felszaporított hibridóma sejtek élősejtszám meghatározását tripánkék festést követően Bürker kamrában végeztük. A bioreaktor beoltásakor a termelő modulba 40 ml sejtszuspenziót fecskendeztünk be, mely  $2 \times 10^6$  sejtet tartalmazott milliliterenként. A bioreaktor forgása során fellépő nyíróerőtől védve a sejteket, cellPROTECT oldatot (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) mértünk a termelőmodulba. A bioreaktor táplálómoduljába 300 ml 10%-os foetális borjúsavót tartalmazó RPMI-1640 tápoldatot öntöttünk, illetve a habzás elkerülése érdekében antiFOAM (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) oldatot adtunk hozzá (8. ábra). A sejtek körül a tápfolyadék áramlását, a bioreaktor folyamatos forgatásával (10 rpm) biztosítottuk, egy univerzális forgató készülékre helyezve a bioreaktort (9. ábra). Az egész rendszert a  $\text{CO}_2$  inkubátorba helyeztük. A bioreaktor termelő moduljából két-három naponta mintát vettünk, a sejtszámot meghatároztuk, majd learattuk a hibridóma sejtek felülúszóját. A folyamatos termelés

fenntartásához, a bioreaktorba  $4 \times 10^7$  sejtet oltottunk vissza, és kiegészítettük 40 ml térfogatra a tápoldatot. A learatott felülúszót 3000 g-vel centrifugáltuk 10 percig, annak érdekében, hogy a sejtektől elválasszuk, majd a felülúszót leöntöttük és  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, a tisztításig.



**8. ábra** MiniPERM bioreaktor hibridóma sejtekkel beoltott állapotban

*Forrás: service-antibodies.eu*

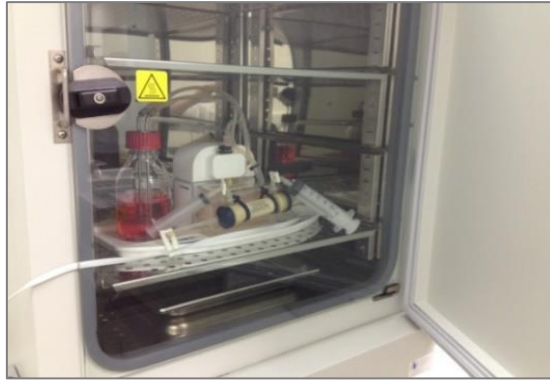


**9. ábra** MiniPERM bioreaktorok a forgató egységgel

*Forrás: www.sarstedt.com*

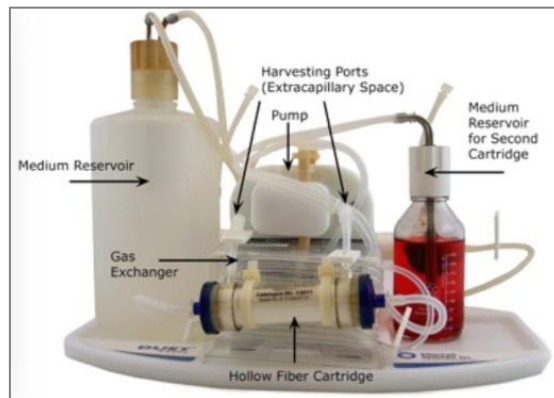
#### **4.3.4 Ellenanyag termelés FiberCell® hollow fiber reaktorban**

Az ellenanyag termeltetésére általunk használt másik rendszer egy hollow fiber reaktor (FiberCell Systems Inc., New Market, USA), amely koncentráltabb ellenanyag termelést tett lehetővé (10. ábra; 11. ábra). A hibridóma sejtek a kapillárosok közötti térben helyezkednek el, melyek tápanyag és gáz ellátása a sűrű kapilláris rendszeren keresztül történik, a tápfolyadék folyamatos áramoltatásának biztosítása mellett (12. ábra).



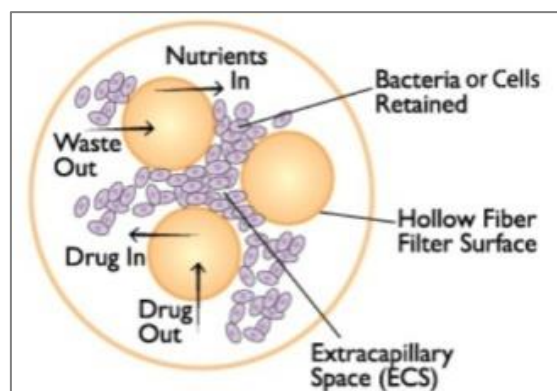
**10. ábra** FiberCell® bioreaktor működés közben, a CO<sub>2</sub> inkubátorba helyezve

*Forrás: www.fibercellsystems.com*



**11. ábra** A FiberCell® bioreaktor rendszerének felépítése

*Forrás: www.fibercellsystems.com*



**12. ábra** A FiberCell® bioreaktor hollow fibre rendszerének működési elve

*Forrás: www.fibercellsystems.com*



A FiberCell® bioreaktor beoltását, a sejtek fenntartását, az ellenanyag aratását az 1. táblázatban leírtak szerint végeztük. Az inokulálásához szükséges  $1 \times 10^8$  számú sejtet, előzetesen sejttenyésztő edényben szaporítottuk fel, majd 20 ml tápfolyadékban felvéve, a sejtszuszpenziót fecskendővel a kazetta (cartridge) kapillárisai közötti tér (ECS) részébe juttattuk, szuszpendáltuk. A rezervoár tartályba 200 ml 10% foetális borjúsavót tartalmazó, 37 °C-ra temperált DMEM tápfolyadékot öntöttünk. A kazettát a hozzá tartozó pumpához kapcsoltuk, és az egész rendszert 5%-os CO<sub>2</sub> inkubátorba helyeztük.

Egy-két naponta mintát vettünk a kazetta rezervoár részéből, és Accu-Check® (Roche Diagnostics, Basel, Svájc) glükózmérővel megmértük a glükóz koncentrációt. Amikor a kezdeti glükóz koncentráció (4,5 g/l) lecsökkent 2 g/l alá (a glükóz fogyasztás  $\geq 50\%$ ), akkor a rezervoár üvegben a tápfolyadékot kicseréltük az 1. táblázatban leírtak szerint. A glükóz mérés során glükóz rátát számoltunk, mely alapján az aratás módja megállapítható.

A glükóz ráta számítása: (kezdeti glükóz szint-aktuális glükóz szint) /napok száma

Amennyiben a glükóz ráta 1000 mg/nap alatti értéket ad, akkor az alacsony glükóz rátájú aratást (LGRH) kell elvégezni. Két-három naponta arattuk le ily módon az ellenanyagot tartalmazó sejtfelülűszót. Az LGRH során csak a sejtfelülűszót nyertük ki a rendszerből, mellyel együtt minimális mennyiségű hibridóma sejt távozott. Húsz ml friss tápfolyadékot fecskendeztünk a kazetta ECS részébe, míg a kazettában lévő felülűszót egy üres fecskendőbe kinyertük, majd 3000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felülűszót leöntöttük és -20 °C-on tároltuk.

Amennyiben a glükóz ráta 1000 mg/nap feletti értéket ad, akkor a magas glükóz rátájú aratást (HGRH) kell elvégezni. A HGRH során a sejtfelülűszó mellett a hibridóma sejtek egy részét is kimostuk a kazettából, megakadályozva a sejtek túlszaporodását. 2 db 20 ml-es fecskendőt csatlakoztattunk a kazettához, majd a rezervoár üvegből átszívunk 10-10 ml tápfolyadékot. 3-4-szer lassan átsuszpendáltuk a kapillárisok közti térben lévő sejtszuszpenziót, majd kinyertük és ezt követően 3000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felülűszót leöntöttük és -20 °C-on tároltuk.

## 1. táblázat A FiberCell® bioreaktor rendszer beoltása, fenntartása

Nap	Glükóz mérés	Tápfolyadék a rezervoárban [ml]	Sejtszám	Feladat (oltás, aratás, passzálás, tápcseré)
0	Igen	200-250	$1 \times 10^8$	Inokulálás
1	Igen	200-250	$4,5 \times 10^8$	Glükóz fogyasztás $\geq 50\%$ → tápfolyadék duplázása
2-5	Igen	400-500	$7,2 \times 10^8$	Glükóz fogyasztás $\geq 50\%$ → tápfolyadék duplázása, áramlás növelése (50 ml/min)
5-7	Igen	500-1000		Glükóz fogyasztás $\geq 50\%$ → tápfolyadék duplázása, áramlás növelése (maximum), ellenanyag aratás
7-10	Igen	1000-2000		Glükóz fogyasztás $\geq 50\%$ → tápfolyadék duplázása, ellenanyag aratás (2 naponta)
10+	Igen	1000-2000		Glükóz fogyasztás $\geq 50\%$ → tápfolyadék cseréje, ellenanyag aratás (2 naponta), leülő sejtek átmosása-hetente

## 4.4 Monoklonális ellenanyag tisztítása és koncentrációja

### 4.4.1 Tisztítás I.

Az összegyűjtött és ellenanyagot tartalmazó sejtfelülűsöket fagyasztott állapotban tároltuk, majd 37 °C-os vízfürdőben kiolvasztottuk, és 16,000 g gyorsulással 15 percig centrifugáltuk a sejtek teljes eltávolítása céljából. A felülűsöket 1mM izopropanolban oldott fenil-metil-szulfonid-fluorid (PMSF) proteáz inhibitorral (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) inkubáltuk 2x30 percen át rázatva, majd az affinitáskromatográfia elvén működő Protein G- Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) oszloppal tisztítottuk. Az oszlopot 20 mM foszfát pufferrel (pH 7,0) mostuk át, majd perisztaltikus pumpa segítségével, 60 cm/h áramlási sebességgel vittük fel az oszlopra a tisztítandó sejtfelülűsöt. Ezt követően 20 mM foszfát pufferrel (pH 7,0) mostuk le az aspecifikusan az oszlophoz kötődött anyagokat. Az ellenanyagot 0,1 M glicin-HCl pufferrel (pH 2,7) eluáltuk. Az eluált frakciók savas pH-ját Tris pufferrel (pH 8.0) neutralizáltuk, a frakciók fehérje tartalmát spektrofotométeren, 280 nm hullámhosszon mértük meg. A frakciókhoz telített ammónium-szulfát oldatot (pH 7,2) adagoltunk 1:1 arányban, az ellenanyag kicsapódott, és ebben az állapotában tároltuk 4°C-on. Használat előtt PBS pufferrel szemben dializáltuk az ellenanyagot.

#### **4.4.2 Tisztítás II.**

A nagyobb mennyiségű felülúszót Fast protein liquid chromatography (FPLC) folyadékkromatográfiás készüléken tisztítottuk. A felülúszót mélységi szűrővel (Sartorius stedim Biotech, Göttingen, Németország) szűrtük le, hogy a sejtektől teljesen mentes legyen, majd izopropanolban oldott 1 mM PMSF proteázgátlót adtunk a felülúszóhoz és kétszer 30 percen át 300 rpm-mel kevertetve inkubáltuk. A felülúszó tisztítását ÄKTA Pure 150 (GE Healthcare, Chicago, IL) készüléken végeztük. 50/40 HiScale MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL) oszlopot használtunk az ellenanyag tisztításhoz, melyet az FPLC készülékbe kötöttünk. Az oszlopot 25 mM Tris HCl pH 8,0 pufferrel mostuk át, addig, míg a pH 7,8-8,0 közötti értékre nem állt be. A fehérjemintát tartalmazó felülúszót felvittük az oszlopra, melyet ezután 25 mM Tris pH 8,0 (+500mM NaCl) pufferrel mostuk át, míg az UV jel értéke nulla közeli értékre csökkent, a nem kötődő fehérjék lemosódtak az oszlopról. A nagy sótartalom miatt a vezetőképesség nőtt, ezért az oszlopot 25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl pH 8,0 pufferrel mostuk, a konduktivitás csökkenéséig. A monoklonális ellenanyagot 100 mM Na-citrát pH 4,7 puffer átáramoltatásával mostuk le az oszlopról, az UV jel emelkedése, majd csökkenése jelezte az ellenanyag eluálódását, melyet külön edényben gyűjtöttünk. Az oszlopot fordított áramlással regeneráltuk 0,2 M NaOH oldattal, majd a lúgos közeget 3 oszloptérfogat PBS pufferrel semlegesítettük.

Az ellenanyagot Na-citrát pH 4,7 pufferben eluáltuk az oszlopról, azonban a PBS pufferben való tároláshoz puffercserét kellett végrehajtani. Sephadex G-25 oszlopot csatlakoztattunk az FPLC készülékhez. PBS pufferrel mostuk az oszlopot, míg a pH elérte a 7,4 értéket, majd felvittük a fehérjemintát az oszlopra. A felvitel után újra PBS pufferrel történő mosás következett. Az UV jel emelkedése jelezte az ellenanyag megjelenését, mely frakciót külön edényben gyűjtöttünk. Végül az oszlopot PBS pufferrel mostuk át addig, míg a konduktivitás és pH állandó értékre álltak be, majd fordított áramlásban 2 oszloptérfogat 0,2 M NaOH oldattal, azt követően pedig 2 oszloptérfogat 15 mM NaOH oldattal regeneráltuk az oszlopot.

#### **4.4.3 Ellenanyag koncentráció és szűrés**

A tisztított ellenanyag koncentrálásához tangenciális szűrőt használtunk. Az Amicon keverős szűrőcellába (Merck Millipore, Burlington, MA) Biomax 30 kDa-os ultraszűrő membránt (Merck Millipore, Burlington, MA) helyeztünk. A cellát mágneses keverővel kevertettük és szűrt, sűrített levegőt áramoltattunk át rajta. A membrán ultratiszta vízzel történő átmosása után, belemértük az ellenanyag-oldatot a keverőcellába, és 300 rpm keveréssel 8-10 mg/ml koncentrációjára töményítettük. A kívánt töménység elérésekor még kétszeres mennyiségű

PBS pH 7,4 puffert öntöttünk a cellába és folytattuk a töményítést. Ezt az atmoszfért kétszer végeztük el. A cellában a fehérjeoldatot óvatosan szuszpendáltuk, majd steril 0,22 µm-es fecskendőszűrővel sterilre szűrtük, mintát vettünk és aliquotáltuk. A mintából az oldat fehérjekoncentrációját, Quick Start Bradford Protein Assay kittel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) állapítottuk meg. A töményített ellenanyagot ezután -80 °C-os fagyasztoóban tároltuk felhasználásig.

## **4.5 A monoklonális ellenanyag diagnosztikai tesztben történő alkalmazása**

### **4.5.1 Az ellenanyag latex mikroszemcsékre való rögzítése**

#### **A latex mikroszemcsék előkezelése**

A latex mikroszemcsék kezelését Amicon keverős szűrőcellában (Merck Millipore Burlington, MA) végeztük. A szűrőcellát mágneses keverővel, 300 rpm-mel kevertettük és szűrt, sűrített levegőt áramoltattunk át rajta 1,5 bar nyomással. A polisztirol latex szuszpenziót (Distrilab, Utrecht, Hollandia) 1%-os hígításban alkalmaztuk, homogenizáltuk, majd a szűrőcellába mértük a latex szuszpenziót és leszűrtük. A fennmaradt latex mikroszemcséket 10 ml 2-morfolino-etánszulfonsav (MES) mosó-aktiváló pufferben szuszpendáltuk fel. A latex szemcsék atmoszférát még kétszer megismételtük, ezt követően a szemcséket homogenizáltuk.

#### **Karboxilcsoportok aktiválása a latex felszínén**

A homogenizált reakcióelegyhez folyamatos kevertetés mellett hozzámértük az aktivátor anyagokat, NHS oldatot, majd EDAC oldatot. A reakcióelegyet folyamatos kevertetés mellett, szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a latexet szűrtük, a száraz latexet 10 ml MES mosó-aktiváló pufferben vettük fel, majd szuszpendáltuk. A latex pufferes atmoszférát még kétszer megismételtük.

#### **Monoklonális ellenanyag rögzítése, kapcsolási reakció**

A szárazra szűrt latexet ezután 7,5 ml MES kapcsoló pufferben vettük fel, és a szuszpenziót homogenizáltuk. Az adott koncentrációjú (6 mg/ml) monoklonális ellenanyagot tartalmazó oldat 2,5 ml-ét folyamatos kevertetés mellett az aktivált latex szuszpenzióhoz adtuk, majd további kevertetéssel szobahőmérsékleten 2,5 órán át inkubáltuk.

## **Lefedés, kioltás**

A cellában kevertetett latexhez az inkubáció letelte után 0,3 ml etanolamint adtunk, majd folytatva a kevertetést, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A monoklonális ellenanyag (Mab)-latex szuszpenziót a keverőcellában leszűrtük, majd 10 ml Tris mosópufferben vettük fel. A felvett latexet homogénre szuszpendáltuk, majd kevertetve, szobahőmérsékleten további 30 percig inkubáltuk. Ezután a latexet szárazra szűrtük, és megismételve az előbbi mosási lépéseket 10 ml Tris mosópufferben újra felvettük.

## **Blokkolás**

Miután a MAb-latexet a mosás után szárazra szűrtük, 10 ml blokkoló oldatot mértünk rá, melyben felszuszpendáltuk, majd homogenizáltuk. Az elegyet kevertetés mellett 2,5 órán át (vagy egy éjszakán át), szobahőmérsékleten inkubáltuk.

## **Átmosás tároló pufferbe**

Az inkubáció végén az elegyet a szűrőcellában szűrtük és a latexet 10 ml tároló pufferben szuszpendáltuk fel, majd újra leszűrtük. A tároló pufferben történő mosási lépést még kétszer megismételtük, végül homogenizáltuk. A MAb-latex reagenst sötét üvegben, 4°C-on tároltuk a hígítás beállításáig.

Az elkészült D-dimer reagenshez a minőségellenőrzési mérések során kalibrációs mestergörbét készítettünk.

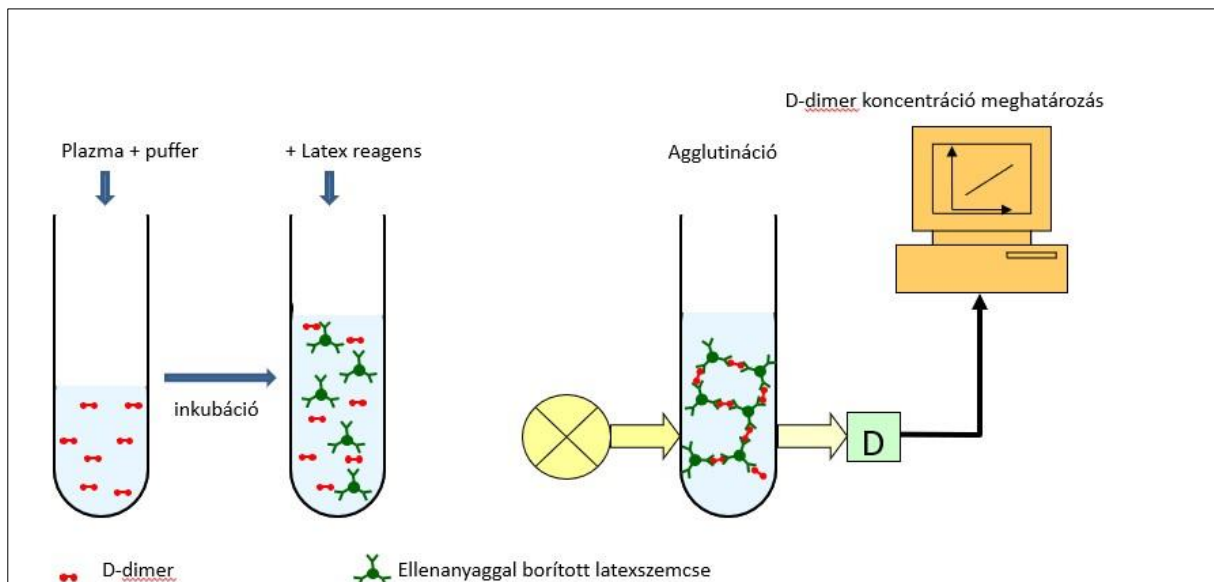
### **4.5.2 A D-dimer reagens használata koagulométeren**

A D-dimer reagenst (Dia-D-DIMER, Diagon Kft., Budapest, Magyarország) Coag XL (Diagon Kft., Budapest, Magyarország) koagulométeren használtuk. A vizsgált minták VACUETTE®9NC (Greiner AG, Kremsmünster, Ausztria), nátrium-citrátos vérvételi csőben levett vérminták, amelyeket 3000 g-vel, 4°C-on, 15 percig centrifugáltunk. Az így kapott vérplazma minták D-dimer koncentrációját mértük meg.

A Coag XL koagulométert a mérések előtt mosófolyadékkal (Dia-SORB, Diagon Kft., Budapest, Magyarország) mostuk át, majd behelyeztük a reagens térbe a D-dimer latex reagenst (R2) és a reagenshez tartozó puffert (R1) (Dia-D-DIMER, Diagon Kft., Budapest, Magyarország) valamint a hígító puffert (Dia-IMIDAZOL, Diagon Kft., Budapest, Magyarország). A kalibráció menüpontban beírtuk a készülékbe az adott reagens-lothoz

tartozó mestergörbe adatokat. A mintatérbe behelyeztük a mérendő plazma mintákat, és elindítottuk a mérést.

A Dia-D-DIMER reagenssel történő mérés az immunturbidimetria elvén alapszik. A mérés során a készülék egy küvettába mérte a plazma mintát és a puffert (R1), majd inkubálást követően hozzámérte az ellenanyaggal borított latexszemcséket tartalmazó reagenst (R2), összerázta és elindult a mérés. A mérés 180 másodperce alatt folyamatosan rögzítette a készülék az elegyben mért optikai denzitást. A reakció során a latex szemcsék felszínét borító ellenanyag reagál a mintában található D-dimerrel, – amely dimer jellegénél fogva több kötőhellyel rendelkezik – és mindez a latexszemcsék agglutinációját eredményezi. Ennek következtében a reakcióelegy turbiditása megváltozik, a mérés kezdeti és végpontja közötti optikai denzitás változása detektálható, melynek mértéke arányos a kezdeti D-dimer koncentrációval (13. ábra).



13. ábra Immunturbidimetriás D-dimer próba mérési elve

## 4.6 A Dia-D-DIMER teszt humán klinikai vizsgálata

### 4.6.1 Mérési körülmények

Az általunk előállított monoklonális ellenanyagra épült D-dimer reagenssel (Dia-D-DIMER, Diagon Kft., Budapest, Magyarország), valamint két másik, kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer teszttel párhuzamosan végeztük humán vérplazma minták D-dimer koncentráció értékeinek meghatározását. A Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet központi laboratóriumában 158 VTE gyanújával vizsgált beteg plazma mintáját kaptuk

meg. A vizsgált személyekről további adatokat személyiségi jogokra hivatkozva nem kaptunk. A zárt rendszerben, nátrium-citrátos puffer oldatot tartalmazó vérvételi csőben (VACUETTE®9NC) (Greiner AG, Kremsmünster, Ausztria) levett vérmintákat 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk (2000 g), különválasztva ezzel a plazmát. A plazma mintákat szétosztottuk több csőbe, és felhasználásig –80 °C-on tároltuk egy héten át. A mintákat összesen három immunturbidimetriás D-dimer teszttel mértük le: INNOVANCE® D-Dimer (Siemens, Marburg, Németország), STA®-Liatest® D-Di (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Franciaország), Dia-D-DIMER (Diagon Kft. Budapest, Magyarország). A mérések elvégzéséhez az adott próbákhoz ajánlott koagulométereket alkalmaztuk: BCS (Siemens, Marburg, Németország), STA Compact (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Franciaország), COAG XL (Diagon Kft., Budapest, Magyarország). A felhasznált vérminták vizsgálata a maradék minták felhasználására vonatkozó törvény hatálya alá esett (lásd az Egészségügyről szóló 1997. évi. CLIV. törvény §210/A paragrafusát). A méréseket a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben végeztük.

#### 4.6.2 A vizsgálatban szereplő D-dimer tesztek jellemzői

Vizsgálatunk során a három teszt közül az INNOVANCE® D-Dimer tesztet – melyet a kórház klinikai döntéshozatalra használt – referens próbának választottuk, és ennek esetében az értékelésnél a gyártó által megadott 0,5 µg/ml FEU küszöbértéket alkalmaztuk. A másik két próbát ezzel a referensnek tekintett teszttel hasonlítottuk össze. A két vizsgált tesztnél a küszöbértékeket 0,2 és 1 µg/ml FEU között változtattuk, így törekedtünk hasonló szenzitivitás- és specificitás értékek elérésére. A gyártók által megadott tesztjellemzőket a 2. táblázat foglalja össze.

**2. táblázat** A vizsgálatban szereplő D-dimer próbák analitikai paraméterei

Módszer elve	Dia-D-DIMER	STA®-Liatest® D-Di	INNOVANCE® D-Dimer
	Immunturbidimetriás próba	Immunturbidimetriás próba	Immunturbidimetriás próba
Mérési tartomány	0,22-8,00 µg/ml FEU	0,27-4,00 µg/ml FEU (20 µg/ml FEU minta hígítással)	0,12-4,46 µg/ml FEU
A próbában alkalmazott ellenanyag	Anti-human D-dimer monoklonális ellenanyag (2B9)	Anti-human D-dimer monoklonális ellenanyag (8D2 és 2.1.16)	Monoklonális ellenanyag (8D3)
Gyártó által kiadott normál érték	< 0,5 µg/ml FEU	< 0,5 µg/ml FEU	< 0,5 µg/ml FEU

### 4.6.3 Statisztikai elemzés

Az értékelés során a küszöbértékek alapján a mintákat pozitív és negatív D-dimerű csoportokba soroltuk. A csoportok közötti összehasonlítást Khí-négyzet statisztikai módszerrel végeztük. Vizsgálatunkban szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  értéket tekintettük. A STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di és Dia-D-DIMER tesztek esetében a különböző küszöbértékeknel számolt diagnosztikai specificitás és szenzitivitás értékeket ROC-görbével ábráztuk. Az ROC görbét az online VassarStats programmal (<http://vassarstats.net/>) készítettük. A tesztek értékeléséhez szükséges, „valós pozitív”, illetve „valós negatív” értékek megadásához az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer teszt eredményeit vettük alapul. A tesztek numerikus eredményeinek az összehasonlítását Bland-Altman korrelációval (Bland és Altman, 1986) végeztük. Az optimális küszöbértékek meghatározásához az osztályozási pontosság (Accuracy), Youden index mutatókat számoltuk.

## 4.7 A Dia-D-DIMER teszt állatorvosi alkalmazása

### 4.7.1 Mérési körülmények

A Dia-D-DIMER teszttel állatoktól származó minták D-dimer mérésére is alkalmaztuk. Hetven kutyától származó vérplazma mintát gyűjtöttünk két budapesti helyszínen, az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ, illetve a Budafoki Állatgyógyászati Központ segítségével. A vérmintákat zárt rendszerben, nátrium-citrátos puffer oldatot tartalmazó VACUETTE<sup>®</sup> vérvételi csőbe (Greiner AG, Kremsmünster, Ausztria) vették le, majd a plazmát centrifugálással (2000 g, 10 min.) nyerték ki. A kutyák átlagkora 8 év és 2 hónap (1,5-14 év között) volt. Nemek szerinti megoszlása: hím 52% és nőstény 48%. A minták közül 50 olyan állattól származott, amelynél valamilyen típusú daganatot diagnosztizáltak (2. sz. melléklet).

Az előbb ismertetett populációban a daganatot hordozó kutyák csoportjában a kiindulási szövet szerint az alábbi daganat típusok fordultak elő: mastocytoma (n=6), lymphoma (n=5), sarcoma (n=10), carcinoma (n=17), insulinoma (n=3), lipoma (n=3), adenoma (n=3), illetve további tumortípusok (n=3). A kontrollpopuláció 20, általunk egészségesnek vélt (daganatmentes) kutyából állt, amelyek folyamatos állatorvosi megfigyelés alatt álltak, rendszeresen kaptak oltást, illetve paraziták elleni kezelést. A vizsgált minták 22 különböző kutyafajtától származtak, illetve 20 esetben keverék kutyától.



A kutya vérplazmákat a Dia-D-DIMER diagnosztikai teszttel (Diagon Kft. Budapest, Magyarország) mértük, és állapítottuk meg a D-dimer koncentrációt. A méréseket Coag XL koagulométeren (Diagon Kft. Budapest, Magyarország) végeztük.

Korrelációs vizsgálat végzéséhez a rendelkezésre álló kutya vérplazmákat a Dia-D-DIMER teszttel párhuzamosan egy másik kereskedelmi forgalomban elérhető D-dimer teszttel (INNOVANCE® D-dimer, Siemens, Marburg, Németország) is megmértük. A két teszt közötti korrelációt Bland-Altman analízissel és lineáris regresszió számolásával vizsgáltuk.

#### **4.7.2 Statisztikai elemzés**

Az egészségesnek vélt kutyák mintái alapján megállapítottuk a kutyák esetében használható referencia tartományt. Ez a csoport a Shapiro-Wilk próba alapján normál eloszlásúnak bizonyult. A  $p$  érték=0,1071, a  $W$  érték= 0,9217, amely a 95%-os elfogadási tartományba esik. A mért adatokból a referencia tartomány alapján pozitív-negatív csoportokat hoztunk létre.

A vizsgálatok során mért D-dimer koncentráció értékek a daganatos és egészséges kutyák csoportjaiban box plottal (Tukey, 1977) kerültek megjelenítésre.

Az egyes csoportok (daganatos kutyák, illetve az egyes daganat típusok a kontroll csoporthoz viszonyítva) közötti különbségeket nem paraméteres Wilcoxon-Mann-Whitney próbával vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  tekintettük szignifikáns különbségnek. A statisztikai számolásokat a Minitab 14.0 statisztikai programmal (Minitab Inc., State College, PA) végeztük.

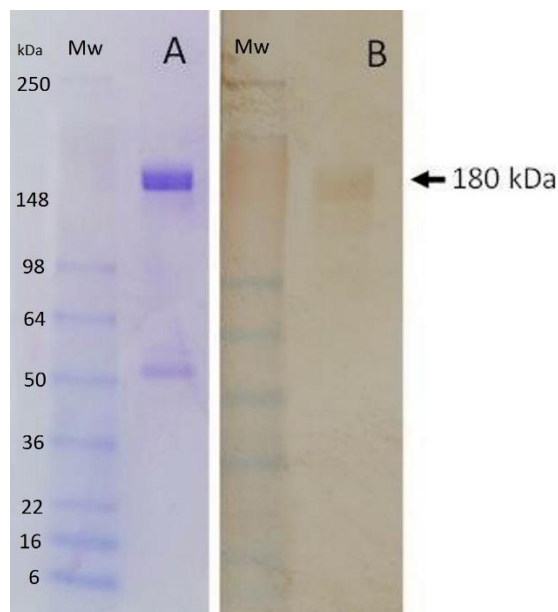
Kísérletet tettünk a D-dimer teszt daganatokra vonatkozó szenzitivitásának és specificitásának meghatározására. A daganatok fajtáinak megállapítása a morfológiai jegyek, a szövettani és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok eredményei alapján történt, mely vizsgálatokat, és a diagnózis felállítását a fent említett állatorvosi központokban végezték.

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 Monoklonális ellenanyag előállítása

#### 5.1.1 D-dimer antigén

Az előállított antigén elektroforetikus (SDS-PAGE) tisztaságát a 14. ábra szemlélteti. A Western blot analízissel azonosított sáv alapján a D-dimer antigén molekulatömege 180 kDa.



**14. ábra** D-dimer antigén SDS-PAGE és Western blot analízise

*Megjegyzés: A: SDS-PAGE (nem redukáló körülmények mellett) B: D-dimer antigén Western blot analízise egy kereskedelmi forgalomban kapható anti-D-dimer monoklonális ellenanyaggal (HyTest Ltd. Turku, Finnország) meghatározva.*

A D-dimer antigént funkcionálisan aktívnak találtuk és koncentrációját 2 mg/ml-nek állapítottuk meg a kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer latex-immunturbidimetriás próbával (DiaSys, Holzheim, Németország).

A fenti jellemzők alapján az előállított D-dimer antigént immunizálásra megfelelőnek találtuk.

#### 5.1.2 Hibridóma sejtvonalak

Hat Balb/c egeret immunizáltunk az előállított, tisztított D-dimer antigénnel. Az ELISA vizsgálat szerint legjobb immunválaszt adó egér lépsejtjeit Sp2/0-Ag14 egér myeloma

sejtekkel fúzionáltuk PEG jelenlétében. A sejtfúzió után keletkezett hibrid sejteket specifikus tápfolyadékban nevelve szelektáltuk, és összesen 576 hibridóma sejtcsoportot kaptunk (15. ábra). A felnövekvő hibridómák felülúszóit saját fejlesztésű indirekt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Az ELISA eredmények alapján 38 olyan pozitív hibridóma sejtcsoportot kaptunk, amelyek a D-dimer antigén ellen ellenanyagot termeltek.

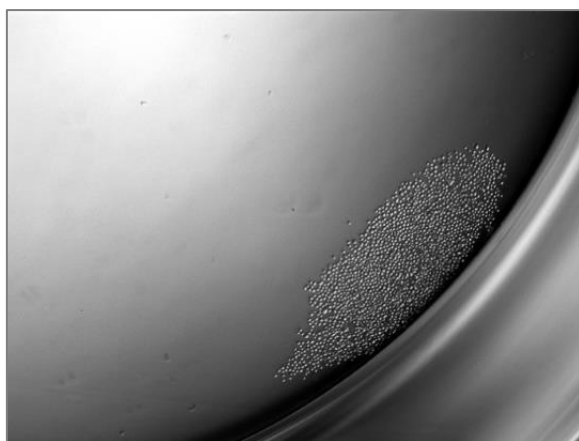


**15. ábra** Hibrid sejtek mikroszkópos felvétele, két héttel a sejtfúziót követően

*Megjegyzés: Nagyítás: 400x; mikroszkóp típusa: Zeiss AxioVert 200*

### 5.1.3 Klónozott sejtvonalak

A D-dimerre pozitív immunreakciót adó sejtcsoportok közül, az általuk termelt ellenanyagok magas titerei alapján a következőket választottuk ki: 1B4, 1H12, 2B9, 2F2, 3B3, 4G8 és a6B9 (16. ábra). Ezeket a sejtcsoportokat végponthígításos módszerrel klónoztuk.



**16. ábra** Klónozás során egy sejtől kialakult sejtcsoport, a mikrotitráló lemez egy vájatójában

*Megjegyzés: Nagyítás: 50x; mikroszkóp típusa: Zeiss AxioVert 200*

#### **5.1.4 Ellenanyag termeltetés**

Az előnyös tulajdonságai alapján kiválasztott klónozott hibridóma sejtvonalat sejttenyésztő edényben folyamatosan fenntartottuk, illetve folyékony nitrogénben tárolt sejtbankot hoztunk létre. A nagyobb mennyiségű ellenanyag termeléséhez többféle rendszert is használtunk. Jelen munkában a rollerkultúra elvéhez hasonlóan működő miniPERM<sup>®</sup> bioreaktor (Sarstedt, Nümbrecht, Németország), illetve a hollow-fibre típusú FiberCell<sup>®</sup> (FiberCell Systems Inc., New Market, MD) rendszereket ismertettem.

A miniPERM<sup>®</sup> bioreaktor termelő részében levő sejtfelülűsző átlagosan 0,1 mg/ml koncentrációban tartalmazta az ellenanyagot, amelyet a felülűsző tisztítása után Bradford-féle fehérjeméréssel (Bradford, 1976) állapítottunk meg. A bioreaktorból heti három alkalommal (2-2-3 naponta) nyertük ki a felülűszőt, ami egy aratás során 40 ml felülűszőt jelentett készülékenként. Mindezek alapján egy miniPERM<sup>®</sup> készülék átlagosan heti 12 mg ellenanyagot biztosított.

A FiberCell<sup>®</sup> bioreaktor ECS részéből nyert sejtfelülűszőből átlagosan 0,2-0,4 mg/ml koncentrációban állapítottuk meg az ellenanyag tartalmát. Az aratást ugyancsak heti három alkalommal végeztük (2-2-3 naponta), az alacsony- illetve magas glükóz rátájú aratási típusoktól függően 40-80 ml felülűszőt nyertünk ki egy készülékből. A FiberCell<sup>®</sup> bioreaktorral mindezek alapján heti 24-96 mg közötti ellenanyag mennyiséget tudtunk termelni.

### **5.2 Monoklonális ellenanyagok jellemzése**

#### **5.2.1 Ellenanyagok izotípusának vizsgálata**

A kiválasztott ellenanyagok osztályát/alosztályát izotípus meghatározó kittel állapítottuk meg. Egyedül a 2F2 jelölésű ellenanyag bizonyult IgM izotípusúnak. A többi vizsgált ellenanyag, az 1B4, 1H12, 2B9, 3B3, 4G8 és a 6B9 jelölésűek mind IgG izotípusúak, nehézláncuk szerint az IgG1 alosztályba sorolhatóak, könnyűláncuk szerint pedig mind  $\kappa$  izotípusú.

#### **5.2.2 Keresztreakciók vizsgálata**

Az ellenanyagok jellemzése során egyik kulcsfontosságú lépés a lehetséges keresztreakciók vizsgálata. A D-dimer antigén mellett az alábbi anyagokat vizsgáltuk: fibrinogén, fibrinogén degradációs termékek (fibrinogén D monomer, és a fibrinogén E monomer) (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Németország), illetve fibrin degradációs termékek (Y, X, D, E) (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Németország) (3. táblázat).

**3. táblázat** A különböző sejtvonalak által termelt ellenanyagok fragmentumokkal adott keresztreakciói.

Ellenanyag	Natív fehérjék		Fragmentumok					
	D-Dimer	Fibrinogén	Fibrinogén		Fibrin			
			D	E	D	E	X	Y
1B4	++++	++	+++	-	++	-	+++	+++
1H12	++++	++	+++	-	++	-	+++	+++
2B9	++++	-	+++	-	+++	-	+	++
2F2	+	++	+	-	+	-	+	+
3B3	++++	+++	+++	-	++	-	+++	+++
4G8	+++	+	++	-	+	-	+	++
6B9	+++	++	++	-	+	-	-	++
Anti-D-Dimer DD3 (HyTest)	+++	-	++++	-	++++	-	+	+++

*Megjegyzés: Indirekt ELISA módszerrel vizsgálva. Referens ellenanyagként egy kereskedelmi forgalomban kapható Anti-D-dimer monoklonális ellenanyagot (DD3) (HyTest Ltd.) alkalmaztunk. Reakció intenzitása: ++++ intenzív; +++ erős; ++ mérsékelt; + gyenge; – nincs reakció.*

Az ELISA eredmények alapján mindegyik vizsgált ellenanyag reagált a D-dimerrel, azonban közülük négy, az 1B4, 1H12, 2B9 és a 3B3 nagyon erős reakciót mutatott a D-dimer antigénnel. Ezek az ellenanyagok ugyancsak reagáltak a fibrin D és fibrinogén D fragmentumokkal, de egyik sem keresztreakált a fibrin E, illetve a fibrinogén E fragmentumokkal. A 4G8 és a 6B9 sejtvonalak által termelt ellenanyagok is erősen reagáltak a D-dimerrel, és csak gyenge vagy mérsékelt reakciót mutattak a D-fragmentumokkal. A leggyengébb D-dimer affinitást a 2F2 ellenanyagnál tapasztaltunk, mely a D, X és az Y fragmentumokkal is gyengén reagált, ellenben a fibrinogénnel, ennél erősebb, közepes reakciót mutatott. A nagy molekulásúlyú fragmentumok (Fibrin X és Y) esetében, az 1B4, 1H12 és a 3B3 ellenanyagok erős reakciót adtak, ellenben a többi ellenanyag ezekkel csak kis mértékben reagált. A fibrinogénnel mutatott keresztreakció a 3B3, 1B4, 1H12, 2F2 és a 6B9 ellenanyagoknál többnyire erős vagy közepes, a 4G8 ellenanyagnál gyenge volt. Ezekkel ellentétben a 2B9 ellenanyag egyáltalán nem adott a fibrinogénnel keresztreakciót. Ezen kiemelkedő tulajdonsága miatt a 2B9 sejtvonalat többször klónoztuk és az így kapott sejtvonalakokat is ellenőriztük, hogy megtartják-e ezt a tulajdonságukat. A 4. táblázat mutatja be a 2B9 sejtvonalak klónjainak keresztreakcióit, mely alapján látszik, hogy ezen sejtvonalak által termelt ellenanyagok nem keresztreakálnak a fibrinogénnel. A D-dimerhez való affinitásuk alapján kiemelkednek a 2B9/F2, 2B9/B1 és a 2B9/D5 klónok ellenanyagai, melyek a D-dimerrel nagyon erős reakciót mutattak.

**4. táblázat** A 2B9 sejtvonala különböző klónjai által termelt ellenanyagok keresztreakciói

Ellenanyag	Natív fehérje		Fragmentumok					
	D-Dimer	Fibrinogén	Fibrinogén		Fibrin			
			D	E	D	E	X	Y
2B9/E9	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/G4	+++	-	+++	+	+++	-	+	++
2B9/F2	++++	-	++++	+	+++	-	+	++
2B9/G12	++	-	++	-	++	-	-	+
2B9/H10	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/F4	+++	-	+++	-	+++	-	++	++
2B9/G1	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/G7	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/D12	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/A4	++	-	+++	-	++	-	-	+
2B9/B1	++++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/B12	+++	-	+++	-	+++	-	+	++
2B9/D5	++++	-	+++	-	+++	-	+	++
Anti-D-Dimer DD3 (HyTest)	+++	-	++++	-	++++	-	+	+++

*Megjegyzés: Indirekt ELISA módszerrel vizsgálva. Referens ellenanyagként a kereskedelmi forgalomban kapható Anti-D-dimer monoklonális ellenanyagot (DD3) (HyTest Ltd.) alkalmaztuk*

*Reakció intenzitása: +++++ intenzív; +++ erős; ++ mérsékelt; + gyenge; – nincs reakció.*

A keresztreakciók vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a 2B9 jelölésű ellenanyag affinitásbeli tulajdonságai hasonlóak voltak a referens ellenanyagként alkalmazott anti-D-dimer monoklonális ellenanyaghoz (HyTest Ltd., Turku, Finnország). Mindkettő ellenanyag erős reakciót mutatott a D-dimerrel, ellenben nem adtak keresztreakciót a fibrinogénnel, és csak gyengén reagáltak a fibrin X és az Y fragmentumokkal. Mi több, a fent említett, kiemelt klónok a D-dimerrel erősebben, míg a D-fragmentumokkal gyengébben reagáltak, mint a referensnek tekintett ellenanyag.

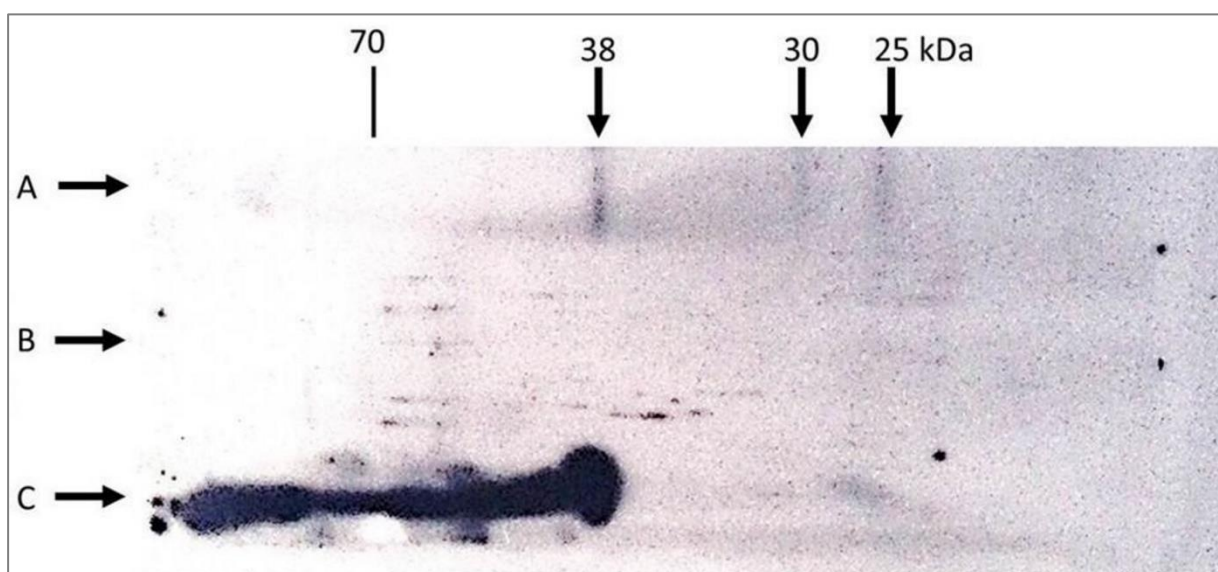
A fentiekkel összhangban – a sejtvonala proliferációs tulajdonságát is figyelembe véve – a 2B9/D5 klónt jelöltük ki a nagyobb mennyiségű ellenanyag termelésére, illetve a felszíni epitóp vizsgálatához.

### 5.2.3 Epitóp meghatározás

Az általunk előállított monoklonális ellenanyag által felismert D-dimer epitóp vizsgálatát a 2B9/D5 klónnal végeztük. Célunk az volt, hogy az epitóp elhelyezkedését minél nagyobb antigén felszín azonosításával elvégezhessük, mindehhez az antigént több lépésben

emésztettük, különböző hasítási tulajdonságú enzimekkel, cianogén-bromiddal, majd kimotripszinnel. Az aktív hasítási termékeket SDS-PAGE-sel és Western blottal azonosítottuk, majd megszekvenáltuk.

A D-dimer antigén felszínén az epitóp térképezés során szekvenciális epitóp helyett, összetettebb, térbeli epitóp struktúrát találtunk. A kimotripszinnel emésztett antigén fragmentumokat redukáló, illetve nem-redukáló körülmények között is elektroforetizáltuk, majd Western blottal analizáltuk. A blottolás során a nem-redukált mintában a 25, 30 és 38 kDa molekulatömegeknél található sávok festődtek meg a membránon, jelezve az antigén-ellenanyag interakciót. A redukált antigén minta esetében nem jött létre reakció (17. ábra).



**17. ábra** D-dimer antigén Western blot vizsgálata 2B9 monoklonális ellenanyaggal

*Megjegyzés: Natív (C) és emésztett D-dimer antigén Western blot vizsgálata 2B9 monoklonális ellenanyaggal. Redukáló (B) és nem-redukáló (A) körülmények végzett vizsgálat*

Az epitóp felszínek meghatározása céljából a szétválasztott, redukálatlan fehérjeminták közül azokat, melyek reagáltak a monoklonális ellenanyaggal, megszekvenáltuk. A 25, illetve 38 kDa molekulatömegű fragmentumok esetében sikerült szekvenciákat kapnunk, míg a 30 kDa-os fragmentumnál nem. A 18. ábra mutatja be a meghatározott szekvenciákat, melyek a B-láncon a 94 IQPDSS- és 140 GNVANTNT- aminosav szakaszok, illetve a C-láncon 23 LQEIYNSNNQ- és 93 VYCEID- szakaszok.

<b>Chain A</b>	
1	VSEDLRSRIE VLKRVKIEKV QHIQLLQKNV RAQLVDMKRL EVDIDIKIRS CRGSCSRALA
61	REVDLKDYED QKQLEQVIA KDLLPSR
<b>Chain B</b>	
1	DNENVVNEYS SELEKHQLYI DETVNSNIPT NLRVLRILE NLRSKIQKLE SDVSAQMEYC
61	RTPCTVSCNI PVSQKECEE IIRKGGTSE MYLIQPDSSV KPYRVYCDMN TENGGWTVIQ
121	NRQDGSVDFG RKWDPYKQGF GNVATNTDYGK NYCGLPGEYW LGNDKISQLT RMGPTELLIE
181	MEDWKGDKVK AHYGGFTVQN EANKYQISVN KYRGTAGNAL MDGASQLMGE NRTMTIHNGM
241	FFSTYDRDND GWLTS DPRKQ CSKEDGGGWW YNRCHAANPN GRYYWGGQYT WDMAKHGTDD
301	GVVWMNWKGS WYSMRKMSMK IRPFFPQQ
<b>Chain C</b>	
1	KMLEEIMKYE ASILTHDSSI RYLQEIYNSN NQKIVNLKEK VAQLEAQCQE PCKDTVQIHD
61	ITGKDCQDIA NKGAKQSGLY FIKPLKANQQ FLVYEIDGS GNGWTVFQKR LDGSVDFEKN
121	WIQYKEGFGH LSPTGTTEFW LGNEKIHLIS TQSAIPYALR VELEDWNGRT STADYAMEKV
181	GPEADKYRLT YAYFAGGDAG DAFDGFDFGD DPSDKFFTSH NGMQFSTWDN DNDKFEGNCA
241	EQDGSQWWMN KCHAGHLNGV YYQGGTYSKA STPNGYDNGI IWATWKTRWY SMKKTMMKII
301	EFNRLTIGEG QQHHLGGAKQ AGDV

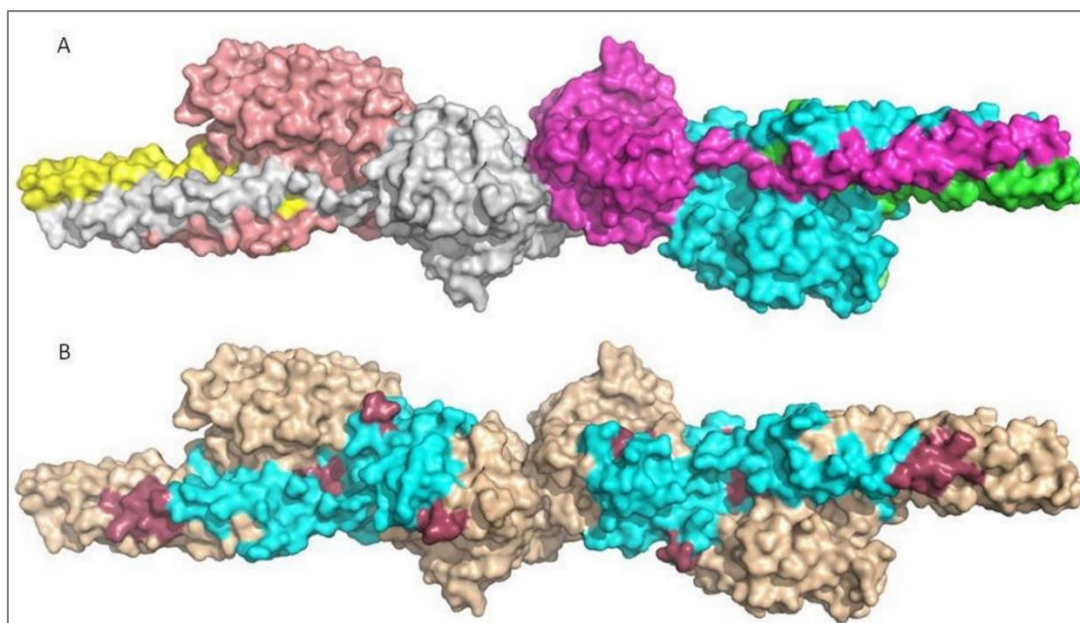
**18. ábra** A fibrin D-monomer A, B, C láncainak aminosav szekvenciája

*Megjegyzés: A szekvenálással általunk meghatározott fragmentumok szürke háttérrel vannak kiemelve. A FXIIIa keresztkötésben részt vevő aminosavaknál félkövér jelölést használtunk.*

Az A-láncon nem tudtuk építőszekvenciát azonosítani, feltehetően ennek oka az lehet, hogy az emésztési folyamat során az N-terminálisuk blokkolódott.

Az azonosított fragmentumok szekvenciái alapján a térbeli építő feltételezhető helyzetét a 19. ábra mutatja be. Ez – az ábra B részén kék színnel jelölt – felület a B és C láncok közel felét teheti ki, utalva a lehetséges interakciós felületek viszonylag nagy méretére.





**19. ábra** A fibrin D-fragmentum láncai (A), epitóp felszínei és a meghatározott, emésztett fragmentumok 3D-s modellje (B)

*Megjegyzés: Jelölések az ábra A jelű részén: sárga és zöld –A lánc; pink és kék –B lánc; ezüst és lila–C lánc. Jelölések az ábra B jelű részén: bézs – nem meghatározott felület, lila – fehérje szekvenálással meghatározott fragmentumok és kék-lehetséges térbeli epitóp.*

*Szerkesztőprogram: Swiss-PdbViewer Deep View v4.1*

*Készítette: Dr. Szenes Áron*

Ahogy a térszerkezetet megjelenítő ábrán is bemutattuk, az általunk azonosított epitóp felszínek egymástól relatív távol helyezkednek el a fibrin alegységeken, mely alapján az epitóphoz kapcsolódó két ellenanyag között nem, vagy csak kis valószínűséggel léphet fel sztérikus interferencia. Ennek köszönhetően a 2B9 monoklonális ellenanyag megfelelő riporter molekulának bizonyul egy latex alapú immunológiai módszerben. Mivel további, a célzott emésztésre alkalmazható, megfelelő specifitású endoproteinázok nem álltak rendelkezésre, így az epitóp felületeinek további szűkítését nem tudtuk elvégezni. További exopeptidázokkal végzett emésztési lépésekkel, és az azt követő protein szekvenálással szűkíthető, pontosítható a jelenleg leírt epitóp felület.

### **5.3 A 2B9 monoklonális ellenanyag diagnosztikai alkalmazása**

A munkánk során előállított 2B9 monoklonális ellenanyagot latex agglutináción alapuló immunturbidimetriás diagnosztikai próbába építettük be. A folyamat során a latex mikroszemcsék felszínén lévő karboxil csoportokat aktiváltuk, majd a monoklonális ellenanyagot a szemcsékre kötöttük fel. Az előállított próba Dia-D-DIMER teszt néven került kereskedelmi forgalomba. A teszt fejlesztése a Diagon Kft.-ben történt, a fejlesztési folyamat, és az annak során előállt termék teljes egészében a Diagon Kft. szellemi tulajdonát képezik.

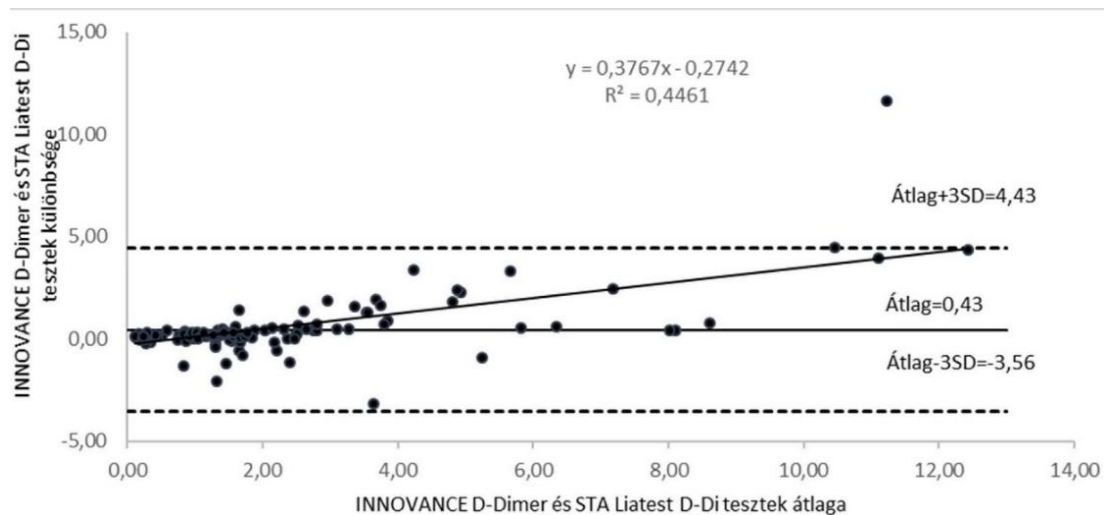
A következőkben bemutatásra kerülő mérési eredményeink a 2B9 ellenanyag gyakorlati diagnosztikai alkalmazását hivatottak szemléltetni a Dia-D-DIMER teszt használatán keresztül.

### 5.3.1 Humán minták D-dimer koncentrációjának mérése

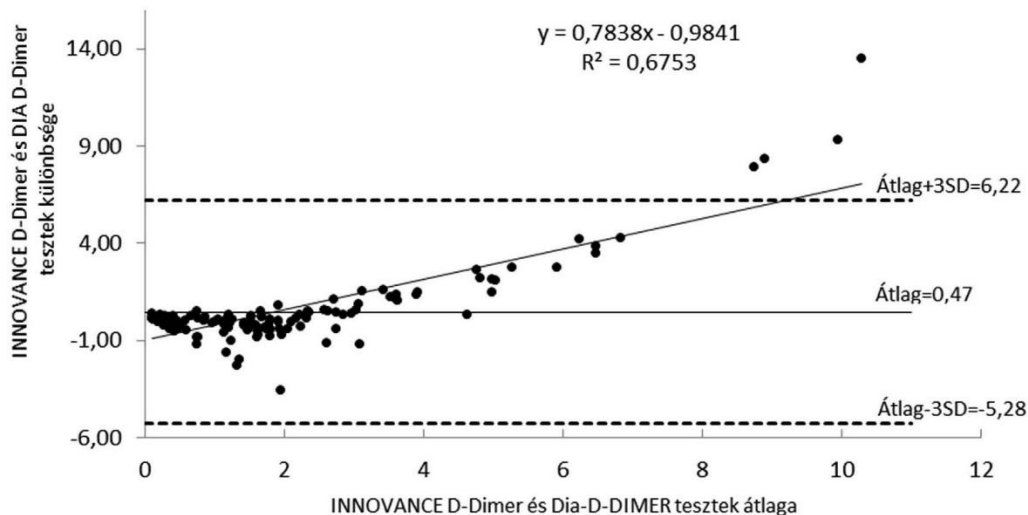
A Dia-D-DIMER teszttel 158 humán plazma minta D-dimer koncentrációját határoztuk meg, két másik, kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer teszttel (STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di; INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer) párhuzamosan mérve.

#### Korrelációs vizsgálatok

A próbák numerikus eredményei közötti kapcsolatot Bland-Altman korrelációval vizsgáltuk, a Dia-D-DIMER és a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztek az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer teszthez viszonyítva vizsgáltuk. A Bland-Altman ábrázolást a 20. ábra és 21. ábra mutatja be (Bland és Altman, 1986). A STA<sup>®</sup> Liatest<sup>®</sup> D-Di és INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer esetében a diagram alapján a próbák átlagos eltérése 0,43, a szórás 1,33, az átlagtól való maximum eltérés 11,64 volt. Az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek összevetésénél a próbák átlagos eltérése 0,47, a szórás 1,92, az átlagtól való maximum eltérés pedig 13,5 volt. Első esetben egy, míg a másodiknál négy minta került kívül az elfogadhatósági határokon.

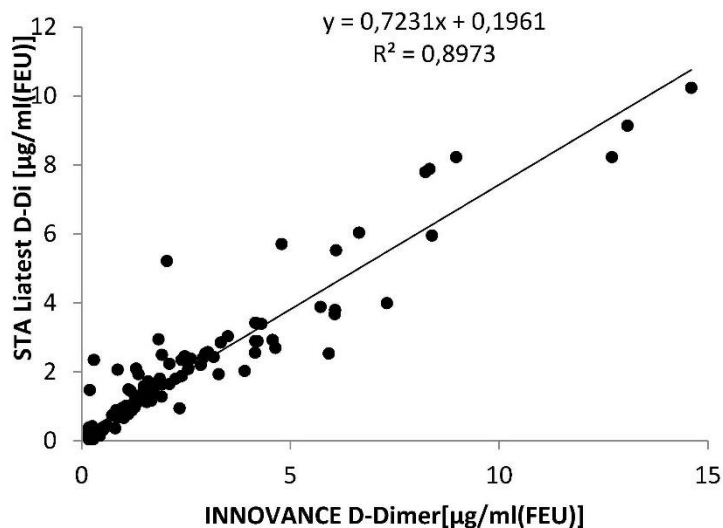


**20. ábra** Bland-Altman korreláció az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer és STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztek között

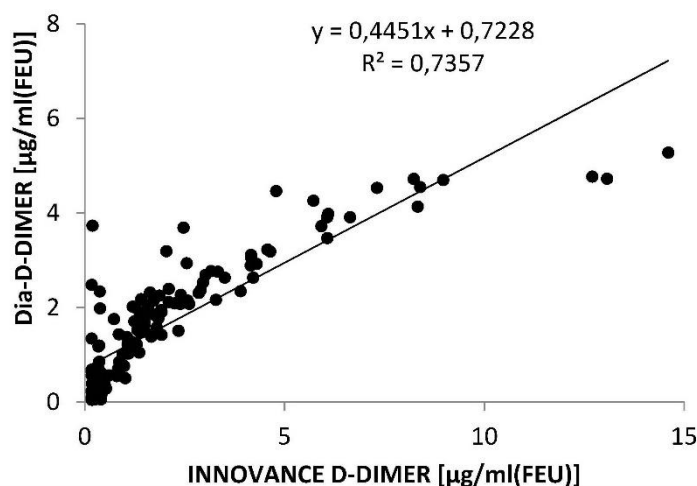


**21. ábra** Bland-Altman korreláció az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek között

A tesztek regressziós analízisét a 22. ábra és a 23. ábra mutatja be. Az  $R^2$  értékek az INNOVANCE®- D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di esetében  $R^2=0,8973$ , míg az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztekénél  $R^2=0,7357$ .



**22. ábra** Lineáris regresszió ábrázolása az INNOVANCE® D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di tesztekkel mért mintákon.



**23. ábra** Lineáris regresszió ábrázolása az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztekkel mért mintákon

### Harmonizálás, a tesztek küszöbértékének változtatása

A három különböző D-dimer teszttel mért koncentráció eredményeket pozitív, illetve negatív D-dimer eredményű csoportokba soroltuk, az egyes próbák során használt küszöbértékek alapján. A STA®-Liatest® D-Di és Dia-D-DIMER teszteknel változtattuk a küszöbértéket, így 0,2 - 1 µg/ml FEU küszöbérték-tartomány esetén is létrehoztunk pozitív és negatív eredményű csoportokat (5. táblázat).

**5. táblázat** Pozitív-illetve negatív csoportokba sorolt páciensek a három próba esetében

Küszöbérték	Pozitív/Negatív	INNOVANCE® D-Dimer	STA®-Liatest® D-Di	Dia-D-DIMER
0,2	P		131 (82,9)	139 (88,0)
	N		27 (17,1)	19 (12,0)
0,3	P		111 (70,3)	127 (80,4)
	N		47 (29,7)	31 (19,6)
0,4	P		104 (65,8)	120 (76,0)
	N		54 (34,2)	38 (24,0)
0,5	P	104 (65,8)	102 (64,6)	118 (74,7)
	N	54 (34,2)	56 (35,4)	40 (25,3)
0,6	P		102 (64,6)	112 (70,9)
	N		56 (35,4)	46 (29,1)
0,7	P		100 (63,3)	107 (67,7)
	N		58 (36,7)	51 (32,3)
0,8	P		97 (61,4)	105 (66,5)
	N		61 (38,6)	53 (33,5)

Küszöbérték	Pozitív/Negatív	INNOVANCE® D-Dimer	STA®-Liatest® D-Di	Dia-D-DIMER
0,9	P		92 (58,2)	103 (65,2)
	N		66 (41,8)	55 (34,8)
1	P		88 (55,7)	103 (65,2)
	N		70 (44,3)	55 (34,8)

Megjegyzés: A STA® Liatest® D-Di és Dia-D-DIMER tesztekénél 0,2-1 µg/ml FEU között változtatott küszöbértékekkel. A cellába írt első számadat az egyének számát mutatja, az összes, 158 beteg közül, míg a zárójeles érték ennek a százalékos kifejezése

Az INNOVANCE® D-Dimer teszttel mérve 104 minta a pozitív, míg 54 a negatív csoportba tartozott. A STA® Liatest® D-Di esetében, a küszöbérték változtatásával 88-131 minta a pozitív és 27-70 a negatív csoportba került. A Dia-D-DIMER teszttel végezve a mérést, 103-139 minta a pozitív, míg 19-55 a negatív csoportba tartozott. A 6. táblázat és 7. táblázat adatai alapján Khí-négyzet statisztikai elemzéssel vizsgáltuk a próbák közötti eltéréseket változtatott küszöbértékek mellett.

**6. táblázat** Khí-négyzet elemzés, az INNOVANCE® D-Dimer és STA®-Liatest® D-Di tesztek pozitív és negatív eredményei alapján

Küszöbérték (µg/mlFEU)	INNOVANCE® D-Dimer	STA®-Liatest® D-Di								
		0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Pozitív	104	131	111	104	102	102	100	97	92	88
Negatív	54	27	47	54	56	56	58	61	66	70
p-érték		0,001	0,398	1,000	0,813	0,813	0,638	0,413	0,164	0,065

Megjegyzés:  $\alpha=0,05$ -ös szignifikancia szint mellett. A p-értékek félkövér jelölése a nem szignifikáns különbséget jelenti

**7. táblázat** Khí-négyzet elemzés, az INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek pozitív és negatív eredményei alapján

Küszöbérték (µg/mlFEU)	INNOVANCE® D-Dimer	Dia-D-DIMER								
		0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Pozitív	104	139	127	120	118	112	107	105	103	103
Negatív	54	19	31	38	40	46	51	53	55	55
p-érték		0,000	0,003	0,048	0,0850	0,333	0,720	0,905	0,906	0,906

Megjegyzés:  $\alpha=0,05$ -ös szignifikancia szint mellett. A p-értékek félkövér jelölése a nem szignifikáns különbséget jelenti

$\alpha=0,05$  szignifikancia szintet választva, a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di teszt 0,3 és 1  $\mu\text{g/ml}$  FEU között változtatott küszöbértékei mellett nem volt szignifikáns különbség az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer teszthez képest ( $p>0,05$ ). A Dia-D-DIMER teszt esetében minél magasabb küszöbértéket választottunk, annál kisebb különbség adódott a pozitív-negatív betegek megoszlásában a referens teszthez viszonyítva.

0,2-0,3  $\mu\text{g/ml}$  FEU küszöbértékeknél szignifikáns volt a különbség a két próba között ( $p<0,05$ ), 0,4  $\mu\text{g/ml}$  FEU-nél határeset ( $p=0,048$ ), és 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  FEU értékeknél, egyértelműen nem volt különbség a tesztek között.

### Szenzitivitás, specificitás, ROC görbe

Meghatároztuk a Dia-D-DIMER és STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztek specificitás és szenzitivitás értékeit a különböző küszöbértékeknél (8. táblázat és 9. táblázat). Referens tesztként az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer tesztet használtuk.

**8. táblázat** Az STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztére megállapított szenzitivitás és specificitás értékek (százalékban), változtatott küszöbértékek mellett

STA <sup>®</sup> -Liatest <sup>®</sup> D-Di Küszöbérték ( $\mu\text{g/mlFEU}$ )	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)
0,2	100	50,0
0,3	100	87,0
0,4	97,1	94,4
0,5	96,2	96,3
0,6	96,2	96,3
0,7	94,2	96,3
0,8	91,3	96,3
0,9	86,5	96,3
1	82,7	96,3

*Megjegyzés: Referencia tesztként az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer tesztet használtuk*

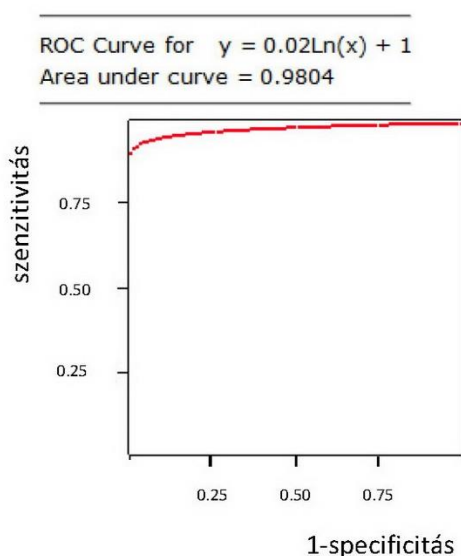
**9. táblázat** A Dia-D-DIMER tesztre megállapított szenzitivitás és specificitás értékek (százalékban), változtatott küszöbértékek mellett.

Dia-D-DIMER Küszöbérték ( $\mu\text{g/mlFEU}$ )	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)
0,2	100	35,2
0,3	99	55,6
0,4	98,1	66,7
0,5	98,1	70,4

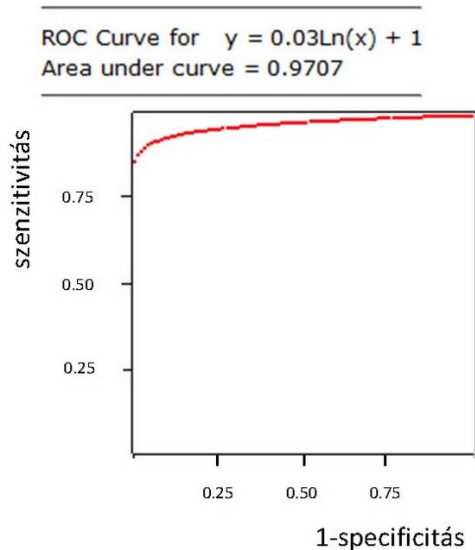
Dia-D-DIMER Küszöbérték ( $\mu\text{g/mlFEU}$ )	Szenzitivitás (%)	Specifititás (%)
0,6	95,2	75,9
0,7	95,2	85,2
0,8	93,3	85,2
0,9	92,3	87
1	92,3	87

Megjegyzés: Referencia tesztként az INNOVANCE® D-Dimer tesztet használtuk

A STA®-Liatest® D-Di szenzitivitás értékei (valós pozitív ráta) 0,2 és 1  $\mu\text{g/ml FEU}$  közötti küszöbértékek esetében 82,7-100% között mozogtak, míg a Dia-D-DIMER tesztre számolva 92,3 és 100% közöttiek az értékek. A próbák specifitása (valós negatív ráta) az előbbi leolvasást követve, 50 és 96,3%, illetve 35,2 és 87% között változik. A különböző küszöbértékekhez rendelt specifitás és szenzitivitás értékek meghatározásával, megszerkesztettük a két próba ROC görbáját a referens teszthez viszonyítva. A görbe alatti terület (AUC) jellemzi a teszt hatékonyságát, melynek értéke a STA®-Liatest® D-Di tesztnél 0,9804 (24. ábra), míg a Dia-D-DIMER tesztnél ez az érték 0,9707 (25. ábra).



**24. ábra** STA®-Liatest® D-Di teszt diagnosztikai hatékonyságát jellemző ROC görbe



**25. ábra** Dia-D-DIMER teszt diagnosztikai hatékonyságát jellemző ROC görbe

### Optimális küszöbérték becslése

A tesztek jellemző osztályozási pontosság (accuracy) és Youden-index adatokat a 10. táblázatok foglalják össze. Az értékek információt adnak az optimális küszöbértékről, melynek becsléséhez a legmagasabb „osztályozási pontosság (0,962, illetve 0,918) és Youden index (0,925, illetve 0,804) értékeket vettük figyelembe, melyek a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztnél a 0,5-0,6, míg a Dia- D-DIMER tesztnél a 0,7 µg/ml FEU küszöbértékhez tartoznak.

**10. táblázat** Accuracy és Youden index értékek STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di különböző küszöbértékei esetében

STA <sup>®</sup> -Liatest <sup>®</sup> D-Di		
Küszöbérték (µg/ml FEU)	Accuracy	Youden index
0,2	0,829	0,500
0,3	0,955	0,870
0,4	0,962	0,916
0,5	0,962	0,925
0,6	0,962	0,925
0,7	0,949	0,905
0,8	0,930	0,876
0,9	0,899	0,828
1	0,873	0,790



**11. táblázat** Accuracy és Youden index értékek Dia-D-DIMER különböző küszöbértékei esetében

Dia-D-DIMER		
Küszöbérték (µg/ml FEU)	Accuracy	Youden index
0,2	0,779	0,352
0,3	0,842	0,546
0,4	0,873	0,647
0,5	0,886	0,685
0,6	0,886	0,711
0,7	0,918	0,804
0,8	0,905	0,785
0,9	0,905	0,793
1	0,905	0,793

### 5.3.2 Kutyáktól származó minták D-dimer koncentrációjának mérése

A mérések során daganatos, illetve egészséges kutyáktól származó vérplazma minták D-dimer koncentrációját mértük meg a Dia-D-DIMER illetve az INNOVANCE® D-Dimer tesztekkel. A daganatos megbetegedésre vonatkozó vizsgálatokat és elemzéseket a Dia-D-DIMER teszttel kapott eredmények alapján végeztük.

### D-dimer koncentráció és tumor összefüggése

A vizsgálatba bevont 70 kutya közül 20 klinikailag egészséges, míg 50 valamilyen daganatos megbetegedésben szenvedő állat volt. A vérplazma mintákat a Dia-D-DIMER immunturbidimetriás diagnosztikai teszttel mértük le, és állapítottuk meg a D-dimer koncentrációt. A D-dimer koncentráció értékek megoszlását a neopláziában szenvedő (benignus, malignus és metastasisist adó) kutyák, illetve az egészséges kontroll csoport között a 12. táblázat mutatja be.

**12. táblázat** Malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjainak, illetve a kontroll csoport mintáiban mért D-dimer koncentráció értékek eloszlása

Csoportok (esetszám)	D-dimer (µg/ml FEU)				
	0,1-0,5	0,5-1	1-2	2-3	>3
Malignus tumor (36)	17	6	6	2	5
Benignus tumor (8)	6	2	-	-	-
Metastasis (6)	2	1	1	-	2
Kontroll (20)	18	2	-	-	-

A kontroll és a daganatos kutyák csoportjaiban mért D-dimer koncentráció értékek tartományát és középértékeit a 13. táblázat mutatja be. A diagnózis alapján a daganatos kutyák csoportjaiban a különböző tumortípusok alapján malignus (n=36) és benignus (n=8) csoportokat alkottunk, olyan mintákat vonva be a csoportokba, melyeknél ez az elkülönítés egyértelműen megállapítható volt. A benignus csoport D-dimer értékei nem tértek el szignifikánsan a kontroll csoporttól (medián=0,34 µg/ml FEU; p=0,1310). Ugyanakkor a malignus csoport koncentráció értékei magasabbak voltak, és jelentős, szignifikáns különbséget mutattak a kontroll csoporthoz képest (medián=0,68 µg/ml FEU; p=0,0002). Az egészséges állatok csoportján belül a D-dimer koncentráció értékek alacsonyok voltak és 0,1-0,58 µg/ml FEU közötti koncentráció tartományba estek, míg a daganatos csoportokban szélesebb koncentráció tartományokat állapítottunk meg, melyekben a legmagasabb érték kiugróan magas, 28,2 µg/ml FEU volt.

**13. táblázat** A kontroll és daganatos kutyák csoportjaiban mért D-dimer koncentráció tartományok, középértékek, és p-értékek

Csoportok (esetszám)		D-dimer (µg/ml FEU)		
		Koncentráció tartomány	Medián	p-érték
Kontroll (20)		0,10-0,58	0,25	–
Neoplasia	Benignus (8)	0,10-0,72	0,34	0,1310
	Malignus (42)	0,10-28,20	0,68	0,0002

Külön csoportként vizsgáltuk azon állatok mintáit, melyeknél áttétet is diagnosztizáltak. Az áttétes daganatban szenvedő kutyák mintáiban a D-dimer koncentráció középértéke 1,01 µg/ml FEU volt, ami a malignus tumor csoport értékeinél is magasabb. Ugyancsak hasonló, szignifikáns különbség mutatkozott a metastasis csoport és a kontroll csoport (p=0,0016) között (14. táblázat).

**14. táblázat** Malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjaiban mért D-dimer koncentráció tartományok, középértékek) és p-értékek

Csoportok (esetszám)	D-dimer (µg/ml FEU)		
	Koncentráció tartomány	Medián	p-érték
Benignus tumor (8)	0,10-0,72	0,34	0,1310
Malignus tumor (36)	0,10-15,50	0,57	0,0007
Metastasis (6)	0,25-28,20	1,01	0,0016

A mintákat a szövettani vizsgálat alapján, a malignitás foka (grade) és a tumor stádiuma (stage) szerint is besoroltuk, amennyiben ez az információ rendelkezésünkre állt. Az így kapott csoportok D-dimer koncentráció tartományait és középértékeit a 15. táblázatok

mutatják be. A malignitás foka szerint az I. csoport medián értéke 0,40 µg/ml FEU volt, míg a II-III. csoportoknál magasabb középértéket kaptunk (0,94 µg/ml FEU). Hasonló következtetésre jutottunk a tumor stádiumok vizsgálata során, ugyanis a magasabb stádiumba (IV-V.) tartozó daganatos kutyák D-dimer koncentráció középértéke is jóval magasabbnak bizonyult (1,50 µg/ml FEU), mint az I-II-III. stádiumú csoportok értéke (0,44 µg/ml FEU).

Vizsgálataink során 3 minta esetében mértünk kiugróan magas D-dimer koncentrációt. Az egyik egy nyolcéves rottweiler kan mintája volt 15,5 µg/ml FEU értékkel, amelynél epehólyag-carcinómát diagnosztizáltak. A másik egy ivartalanított nőtény keverék kutya, amelynek emlőcarcinómája volt, mellüregi áttéttekkel (15,1 µg/ml FEU). A legmagasabb koncentráció értéket, 28,2 µg/ml FEU-t egy nyolcéves hím argentin dog mintájában mértük, amelynek már előrehaladott stádiumú T-sejtes lymphomája volt.

**15. táblázat** A malignitás fokát jelölő csoportok D-dimer koncentráció tartományai és középértékei

Malignitás foka (esetszám)	D-dimer (µg/ml FEU)	
	Koncentráció tartomány	Medián
I (14)	0,10-15,50	0,40
II-III (20)	0,10-4,75	0,94

**16. táblázat** A daganat stádiumát jelölő csoportok D-dimer koncentráció tartományai és középértékei

Stádium (esetszám)	D-dimer (µg/ml FEU)	
	Koncentráció tartomány	Medián
I-II-III (35)	0,10-4,74	0,44
IV-V (10)	0,19-28,20	1,50

A daganatos csoportokat a daganattípusok szerint is vizsgáltuk. A csoportosítást a szövettani vizsgálatok alapján a daganat eredete szerint végeztük. Így 7 különböző csoportot alkottunk: (mastocytoma (n=6), lymphoma (n=5), sarcoma (n=10), carcinoma (n=17), insulinoma (n=3), lipoma (n=3), adenoma (n=3), illetve egy nyolcadik csoportot, melybe az előző csoportokba egyértelműen nem sorolható tumorkok kerültek. A különböző daganattípusoknál mért D-dimer koncentráció értékek eloszlását, a koncentráció tartományokat, középértékeket és a csoportok kontroll csoporttól való eltérését jelző p-értékeket a 17-18. táblázatok mutatják be.

A kontroll csoporthoz viszonyítva a legmagasabb D-dimer középértéket a malignus tumorokhoz tartozó lymphomával diagnosztizált ebek csoportjánál kaptunk (1,72 µg/ml FEU). Vizsgálataink során a carcinomában szenvedő állatok csoportjánál is jelentősen magas 0,83 µg/ml FEU középértéket kaptunk. A lipoma, insulinoma betegcsoportoknál a kontrollhoz hasonlóan alacsony középértéket tapasztaltunk, bár ezekben a csoportokban a mintaszám is alacsony volt. A Mann -Whitney statisztikai próbával vizsgálva, a mastocytoma csoport (p=0,1024) szignifikánsan nem különbözött a kontroll csoporttól. A lymphoma (p=0,0114), sarcoma (p=0,0005), carcinoma (p=0,0022) csoportok ellenben szignifikáns különbséget mutattak.

**17. táblázat** Az egyes daganattípusok és a kontroll csoportaiban mért D-dimer koncentráció értékek eloszlása

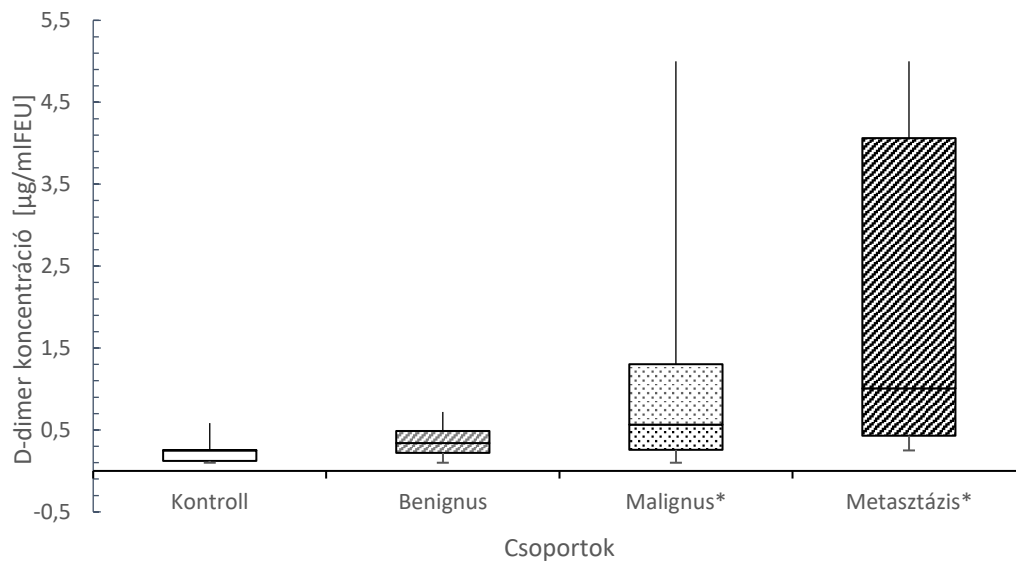
Csoportok (esetszám)	D-dimer (µg/ml FEU)				
	0,1-0,5	0,5-1	1-2	2-3	>3
Mastocytoma (6)	4	-	-	2	-
Lymphoma (5)	1	1	1	-	2
Sarcoma (10)	4	4	1	-	1
Carcinoma (17)	7	2	5	-	3
Lipoma (3)	2	1	-	-	-
Adenoma (3)	2	1	-	-	-
Insulinoma (3)	2	-	-	-	1
Más daganattípusok (3)	3	-	-	-	-
Kontroll (20)	18	2	-	-	-

**18. táblázat** Az egyes daganattípusok és a kontroll csoport D-dimer koncentráció tartományai, középértékei és p-értékek

Szöveti eredet szerint	Csoportok (esetszám)	Koncentráció-tartomány	Medián	p-érték
		µg/ml FEU		
	Kontroll (20)	0,1-0,58	0,25	-
Kötőszövet	Lipoma (3)	0,26-0,51	0,31	N/A
	Mastocytoma (6)	0,1-2,38	0,38	0,1024
	Sarcoma (10)	0,12-3,77	0,67	0,0005
Hám	Adenoma (3)	0,1-0,72	0,48	N/A
	Carcinoma (17)	0,10-15,5	0,83	0,0022
Nyirokrendszer	Lymphoma (5)	0,14-28,2	1,72	0,0114
Exokrin	Insulinoma (3)	0,1-3,85	0,25	N/A
-	Más daganattípusok (3)	0,10-0,37	0,26	N/A

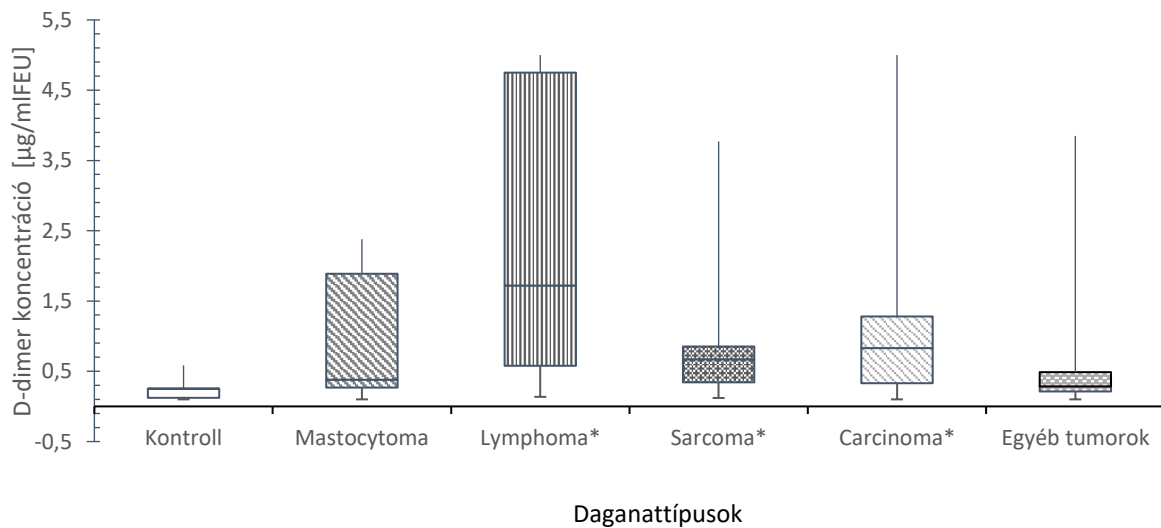
N/A: Alacsony esetszám miatt, az adat nem áll rendelkezésre.

Az egyes daganatos csoportok egymáshoz, illetve a kontroll csoporthoz való viszonyát boxplot diagrammal ábrázoltuk (26. ábra).



**26. ábra** A malignus, benignus és áttétes daganatban szenvedő kutyák csoportjaiban, illetve a kontroll csoportban mért D-dimer koncentrációk ábrázolása boxplot diagrammal

*Megjegyzés: A csillagok a kontroll csoporttól való szignifikáns eltérést jelölik.*



**27. ábra** Az egyes daganattípusok és a kontroll csoportban mért D-dimer koncentrációk ábrázolása boxplot diagrammal

*Megjegyzés: A csillagok a kontroll csoporttól való szignifikáns eltérést jelölik.*

Az egészséges kutyák mintái alapján felállítottuk a kutya vérplazma minták vizsgálata során alkalmazható referencia tartományt (<0,69 µg/ml FEU). A küszöbérték alapján pozitív/negatív D-dimer eredményű csoportokat hoztunk létre.

Változtatott küszöbérték mellett, a kutyák diagnosizai alapján (egészséges, illetve beteg kategóriák) meghatároztuk a Dia-D-DIMER teszt daganatokra vonatkoztatott szenzitivitás, specificitás, valamint pozitív, illetve negatív prediktív értékeit (PPV és NPV). Eredményeink szerint a 0,3-0,6 µg/ml FEU-ig terjedő küszöbérték mellett, a szenzitivitás 33 és 51%, míg a specificitás 85 és 100% között mozgott (19. táblázat).

Az általunk meghatározott 0,69 µg/ml FEU küszöbérték alkalmazásával 33%-os szenzitivitás mellett, 100%-os specificitást értünk el. A pozitív prediktív érték 100%, míg a negatív prediktív érték 29% a daganatos minták esetében.

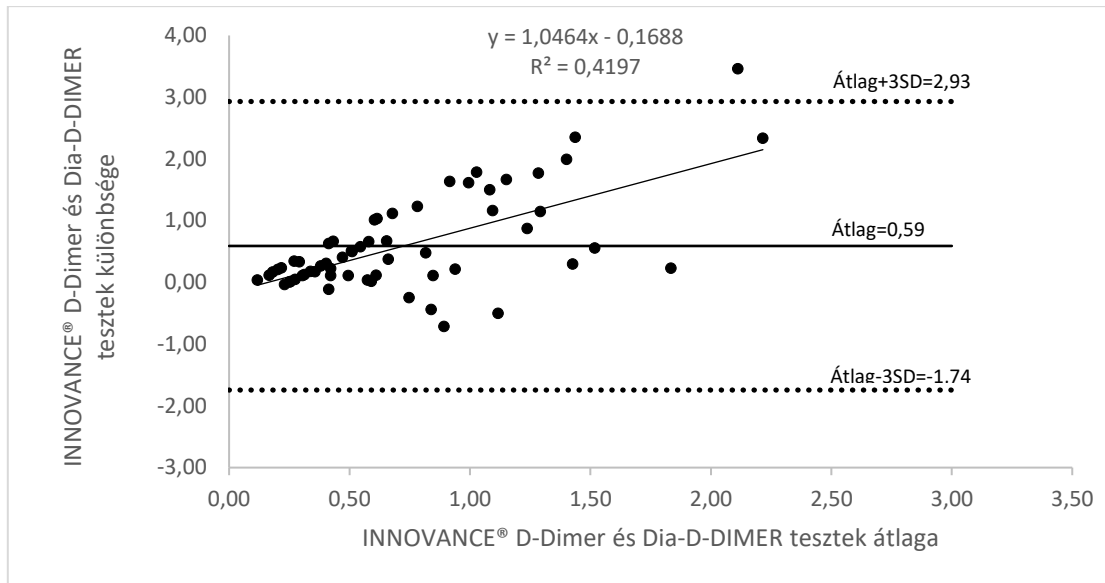
Következésképpen a Dia-D-DIMER teszt esetében a 0,69 µg/ml FEU küszöbérték alatti mintákat tekintettük negatív D-dimer értékűnek malignancia szempontjából, míg e fölött pozitívnak ítéltük a vizsgálat eredményét.

**19. táblázat** A Dia-D-DIMER teszt, daganatokra vonatkoztatott szenzitivitás, specificitás, PPV, NPV értékei százalékban kifejezve, különböző küszöbértékek alkalmazása esetén

Küszöbérték (µg/ml FEU)	Szenzitivitás %	Specificitás %	PPV %	NPV %
>0,3	51	85	92,5	32,1
>0,4	41	85	90,9	28,3
>0,5	37	90	93,1	28,1
>0,6	33	100	100	29
>0,69	33	100	100	29

### Korrelációs vizsgálatok

A kutyáktól származó vérplazma mintákat a Dia-D-DIMER teszt mellett az INNOVANCE® D-Dimer teszttel is lemértük. A két próba numerikus eredményei közötti kapcsolat vizsgálatára Bland-Altman analízist használtunk, mellyel a mért D-dimer értékek átlagos különbségét (0,59) az átlagos eltérés szórását (0,78) és a két mérés 95%-os egyezési határértékeit határoztuk meg. Az átlagtól való maximum eltérés 3,56 volt (28. ábra).



**28. ábra** INNOVANCE® D-Dimer és Dia-D-DIMER tesztek Bland-Altman analízise

Az egészséges kutyák mintái alapján az INNOVANCE® D-Dimer tesztnél is meghatároztunk egy kutyákra vonatkoztatott referencia tartományt, mely alapján 1,03 µg/ml FEU küszöbérték alatti mintákat tekintettük negatív D-dimer értékűnek.

Mindkét próba esetében az általunk meghatározott küszöbértékek szerint pozitív és negatív eredményű csoportokba rendeztük a mért mintákat. KHI-négyzet statisztikai elemzéssel  $p=0,3298$  értéket kaptunk  $\alpha=0,05$  szignifikancia szint mellett, mely alapján nem különbözött szignifikánsan a két teszt, kutya mintákon való alkalmazás során.

## 6 MEGBESZÉLÉS

### 6.1 Az előállított ellenanyag tulajdonságai

Az előállított új, 2B9 monoklonális ellenanyag teljesíti a 3.2.3 pontban, az immunturbidimetriás D-dimer próba működési elve alapján felállított feltételeket az alábbiak szerint.

#### 6.1.1 A keresztreakciók vizsgálatának jelentősége

A keresztreakciók vizsgálatának eredménye alapján kijelenthetjük, hogy a 2B9 megfelelő specificitással ismeri fel a D-dimer antigént, nem reagál a fibrinogénnel, mely kiemelkedően fontos jellemzője egy D-dimer diagnosztikai próbában alkalmazható ellenanyagnak.

Adam és munkatársai (2009) a D-dimer mérés kapcsán felmerülő problémákat vizsgálták tanulmányukban. A D-dimer tesztek legfőbb gyengeségének azt tartották, hogy a különböző próbák nem képesek megfelelően megkülönböztetni a fibrin degradációs termékeket a fibrinogéntől (Adam és mtsai., 2009; Longstaff és mtsai., 2016). A D-dimer harmonizációjával foglalkozó közleményükben található ajánlás szerint, a D-dimer teszteknek nem kellene fibrinogénnel vagy fibrinogén degradációs termékekkel reagálni, sem olyan fibrin és fibrinogén fragmentumokkal, melyek – a plasminon kívül – más enzimek által kiváltott proteolízis során keletkeztek. Következésképpen a D-dimer ellen termelt ellenanyagok jellemzésekor a keresztreakciók vizsgálata egy kulcsfontosságú lépés, mely során megállapítható, vagy éppen kizárható az ellenanyag esetleges keresztreakciója a fibrinogénnel.

A szakirodalomban fellelhető és a kereskedelemben is igen elterjedten használt DD-3B6/22 monoklonális ellenanyag a D-dimert is tartalmazó, keresztkötött fibrin fragmentumokat ismeri fel, és a fibrinogénnel vagy annak degradációs termékeivel nem ad keresztreakciót (Elms és mtsai., 1986).

Hart és mtsai. (1994) arra mutattak rá tanulmányukban, hogy a kereskedelemben kapható ELISA elvén működő D-dimer tesztek többsége két ellenanyagot alkalmaz. Az egyik egy fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag („capture”), a másik viszont egy kevésbé specifikus, a fibrinogénnel is keresztreakáló ellenanyag. Vizsgálataik során két különböző ELISA rendszert hasonlítottak össze, melyeknek specifikus, „capture” ellenanyaga megegyezett (mindkét próbában a DD-3B6/22 ellenanyagot alkalmazták) ellenben a második



ellenanyaguk különböző mértékben keresztreakált a fibrinogénnel. Azt vizsgálták, hogy a fibrinogénnel adott keresztreakció befolyásolja-e a keresztkötött fibrin fragmentumok valódi szintjének megállapítását, jóval magasabb koncentráció értéket eredményezve. Azt tapasztalták, hogy amikor fibrinogenolysist indukáltak a normál mintákban, a két próba eredményei rendkívül nagy különbségeket mutattak. A fibrinogénnel reagáló ELISA próba esetében 25-szörös (normál, 36 +/- 27 ng/ml; kezelt, 833 +/- 272 ng/ml) koncentráció emelkedést tapasztaltak, míg a fibrinogénnel nem reagáló ELISA-nál nem jelentkezett emelkedés (normál, 24 +/- 21 ng/ml; kezelt, 27 +/- 22 ng/ml). Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a magas fibrinogén, illetve fibrinogénszármazékot tartalmazó mintákban pontosabban megállapítható a D-dimer koncentráció olyan tesztek alkalmazásával, melyek fibrinogénnel nem reagáló ellenanyagokat tartalmaznak.

Az általunk termelt ellenanyagok keresztreakció vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a megvizsgált hét különböző ellenanyag közül négy erős vagy mérsékelt, kettő pedig gyenge reakciót mutatott a fibrinogénnel. Ellenben a 2B9 ellenanyag megfelelő specificitásúnak bizonyult, mivel nem keresztreakált a fibrinogénnel. Ez az előnyös tulajdonsága teszi lehetővé, hogy a fibrinogéntartalmú citrátos plazma, vagy akár teljes vérminták mérésére is alkalmas lehessen (Dempfle, 2005b) a 2B9 ellenanyagot hordozó diagnosztikai próba.

A keresztreakció vizsgálat további pozitív eredményének tekintettük, hogy a 2B9 ellenanyag a nemzetközileg is elismert ellenanyaggyártó cég (HyTest Ltd., Turku, Finnország), Anti-D-dimer monoklonális ellenanyagához, mint referens ellenanyaghoz hasonló tulajdonságokat mutatott a keresztreakciók tekintetében. Mindkét ellenanyag reagált a D-dimerrel, ellenben nem adtak keresztreakciót a fibrinogénnel és gyenge reakciót mutattak a fibrin X és az Y fragmentumokkal. Ezen felül, egyes 2B9 klónok a D-dimerrel erősebben, míg a D-fragmentumokkal gyengébben reagáltak, mint a referensnek tekintett ellenanyag.

### **6.1.2 Az epitóp térképezés értékelése**

Az epitóp analízis alapján elmondhatjuk, hogy a 2B9 ellenanyag szimmetrikusan elhelyezkedő epitópokat ismer fel a D-dimer felszínén, amelyek egymástól relatív távol helyezkednek el, ezáltal pozíciójuk szterikusán lehetővé teszi és megkönnyíti az ellenanyaggal borított latex mikroszemcsék agglutinációját.

A kereskedelmi forgalomban kapható anti-D-dimer monoklonális ellenanyagok a XIIIa faktor által keresztkötött fibrin fragmentum D-doménjének felszínén lévő epitópokat ismerik fel.

Ezen monoklonális ellenanyagok mindegyike más és más specificitással rendelkezik (Dempfle, 2005b). Közülük néhány ellenanyag epitóp-térképezését elkészítették, majd publikálták.

Az első szabadalmaztatott anti-D-dimer monoklonális ellenanyagot (DD-3B6/22) Rylatt és munkatársai állították elő (Rylatt és mtsai., 1983). Wylie és munkatársai vizsgálata szerint a DD-3B6/22 ellenanyag által felismert epitóp felszín a gamma polipeptid lánc 86 és 88 aminosavai között, illetve az alfa polipeptid lánc 105 és 110 aminosavai között helyezkedik el (Devine és Greenberg, 1988; Wylie és Walsh, 1997). Egy másik, B4 jelölésű D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag – melyet Doh és munkatársai (2006; 2015) állítottak elő –, a béta polipeptid lánc N-terminális régiójánál lévő 134 és 142 aminosavak közötti antigén felszíni szakaszt ismeri fel.

A van der Graaf és mtsai. (2000) által közölt lista szerint (20. táblázat) az elmúlt évek során a kutatók számos D-dimer-specifikus ellenanyagot állítottak elő, melyeket diagnosztikai próbákban is alkalmaztak. Ugyanakkor ezen ellenanyagok többségének az epitóp meghatározása a legjobb tudomásunk szerint, sajnálatos módon a szakirodalomban nem található meg.

**20. táblázat** A kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer tesztek mérési elve és az alkalmazott ellenanyagok

<b>A próba megnevezése</b>	<b>Mérési elv</b>	<b>Ellenanyag(ok)</b>
<i>Minutex D-Dimer</i> (Biopool, Umeå, Svédország)	Szemikvantitatív latexagglutinációs teszt	8D3
<i>SimpliRED D-Dimer</i> (Agen Biomedical Ltd., Brisbane, Ausztrália)	Vörösvértest agglutinációs teszt	3B6/22
<i>NycoCard D-Dimer</i> (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norvégia)	Laminált tesztkártya	S4H9
<i>INSTANT I.A. D-Dimer</i> (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország)	Kvalitatív ELISA	7G2(Fab') <sub>2</sub> fragmentum +2F7(Fab') fragmentum
<i>VIDAS D-Dimer</i> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Franciaország)	Kvantitatív ELISA (teljesen automatizált)	Anti D-Dimer MAb (10B5E12C9) + anti-D-Dimer Mab (2C5A10)
<i>Tina-quant a D-Dimer</i> (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország)	Kvantitatív immunturbidimetriás D- dimer teszt (teljesen automatizált)	Anti-human D-Dimer MAb JIF-23
<i>LIATEST D-Dimer</i> (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország)	Kvantitatív immunturbidimetriás D- dimer teszt (teljesen automatizált)	8D2 and 2.1.16
<i>IL Test D-Dimer</i> (IL-DD, Instrumentation Laboratory)	Kvantitatív immunturbidimetriás D- dimer	8D3

A próba megnevezése	Mérési elv	Ellenanyag(ok)
SpA, Milano, Olaszország)	teszt (teljesen automatizált)	
<i>BC D-Dimer és Turbiquant D-Dimer</i> (Dade Behring, Marburg, Németország)	Kvantitatív D-Dimer teszt	Anti-human D-Dimer MAb (DD5)
<i>Asserachrom D-Dimer</i> (Diagnostica Stago, Asnières, Franciaország)	ELISA	Anti-human D-Dimer MAb(2F7) + poliklonális anti- FDP-D
<i>Enzygnost D-Dimer micro</i> (Dade Behring, Marburg, Németország)	ELISA	Anti-human D-Dimer MAb (DD5) + poliklonális anti-fibrinogen
<i>Fibrinostika FbDP</i> (Organon Teknika, Turnhout, Belgium)	ELISA	Anti-FgDP/FbDP MAb (FDP 14) + monoklonális anti-FbDP (FDP DD13)

*Forrás: saját szerkesztés van der Graaf és mtsai. (2000) alapján)*

Az általunk elvégzett epitóp analízis szerint a 2B9 monoklonális ellenanyag eltérő szekvenciákat ismer fel a D-dimer felszínén, mint más, a szakirodalomban fellelhető D-dimer specifikus ellenanyagok. A 2B9 ellenanyag a béta polipeptid láncon a 94-99 és 140-147 aminosavakat, illetve a gamma láncon a 23-32 és 93-98 aminosavakat ismeri fel.

Az általunk előállított 2B9 D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag epitóp vizsgálata arra enged következtetni, hogy az epitópok az antigén felszín több különböző részén, térbeli felismerő helyet alkotva helyezkednek el. Azt, hogy egy térbeli epitóp egy szekvenciális epitóphoz képest előnyösebb, vagy éppen hátrányosabb elrendezést jelent, a szakirodalmi adatok alapján nem lehet egyértelműen megállapítani.

Azt feltételezzük, hogy bizonyos esetekben egy térbeli epitóp további diagnosztikai előnyt hordozhat magában. Összevetve a 2B9 jelzésű ellenanyagot alkalmazó diagnosztikai tesztet, más kereskedelmi forgalomban elérhető D-dimer tesztekkel, – amelyeknek az ellenanyaga szekvenciális epitópot ismer fel – feltételezhető, hogy a térbeli epitópot felismerő ellenanyag, olyan antigénnel is reagálhat, mely nem egy, a szekunder fibrinolysis során keletkezett kereszt kötött fragmentum. Ezt a tesztet más, – megfelelő szekvenciális epitópot alkalmazó – D-dimer tesztel együttesen használva más, olyan típusú betegségek is diagnosztizálhatóak lehetnek, melyekben az emelkedett D-dimer (vagy oligomer) értéket nem a trombotikus aktivitás eredményezte.

A 6.1.1 és 6.1.2 pontokban értékelt eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az általunk előállított 2B9 monoklonális ellenanyag alkalmas latex agglutináció elvén alapuló diagnosztikai tesztben való használatra.

## **6.2 Az előállított ellenanyag gyakorlati alkalmazása**

A jelen értekezésben bemutatott 2B9 D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag felhasználásával a magyarországi tulajdonú Diagon Kft. által egy *in vitro* diagnosztikai (IVD) immunturbidimetriás D-dimer teszt – nevezetesen Dia-D-DIMER teszt – került kifejlesztésre. A termék átesett klinikai teljesítményértékelésen, és CE-jellel ellátott, jelenleg is kereskedelmi forgalomban van. Az értekezésnek további részét képezte a 2B9 ellenanyagot hordozó Dia-D-DIMER tesztnek, mint diagnosztikai eszköznek gyakorlati használata, amellyel humán, illetve állatoktól származó mintákat is vizsgáltunk (Holczer és mtsai., 2016).

### **6.2.1 A Dia-D-DIMER teszt humán klinikai vizsgálata**

A Dia-D-DIMER tesztet elsősorban humán minták vizsgálatára fejlesztettük. A próbával végzett méréseink egy részében humán plazma minták D-dimer koncentrációit határoztuk meg. Az eredményeket másik két D-dimer teszttel vetettük össze, megvizsgáltuk az eltéréseket, majd kísérletet tettünk a Dia-D-DIMER teszt optimális küszöbértékének meghatározására.

### **A Dia-D-DIMER teszt humán vonatkozású eredményeinek értékelése**

A 2B9 D-dimer specifikus monoklonális ellenanyagra épülő kereskedelmi teszt klinikai teljesítményértékelése sikerrel zárult, ezen kívül további, a teszt teljesítményének jellemzésére irányuló vizsgálatokat végeztünk humán minták bevonásával.

Munkánk során a humán vérplazma minták vizsgálatakor célunk az volt, hogy a Dia-D-DIMER tesztet és két másik, forgalomban lévő D-dimer tesztet összehasonlítsunk. Egy tesztet közülük referensnek jelöltünk ki, és ehhez képest jellemeztük a többi tesztet az alábbi paraméterek megadásával: ROC-görbe, szenzitivitás ésspecificitás (Zweig és Campbell, 1993).

Referens tesztként önkényesen az INNOVANCE D-Dimer-t jelöltük ki és a másik két tesztet ehhez hasonlítottuk. E két teszt küszöbértékét változtattuk és azt vizsgáltuk, hogy ebből eredően hogyan változik a tesztek által adott eredmény, illetve az optimális küszöbértéket kerestük, melyet több szempont alapján vizsgáltunk.

A laboratóriumok általában egyöntetűen a 0,5 µg/ml FEU küszöbértéket használják a VTE kizárására. Ez azonban nem teljesen helyes eljárás, a küszöbérték ugyanis több tényezőtől is függhet, például magától a vizsgált populációtól is. A szakirodalomban több

tanulmányban is felhívják a figyelmet arra, illetve maguk a diagnosztikai teszt gyártók is többnyire azt javasolják, hogy a küszöbértéket a laboratóriumok saját maguk határozzák meg (Adam és mtsai., 2009; Mullier és mtsai., 2014; Olson és mtsai., 2013; Reber és Moerloose, 2013).

Munkánkban 158, a Semmelweis Egyetemen kezelt beteg mintáján végeztük el az összehasonlítást, akiknek a jelentős hányadánál a referens teszt alapján magas D-dimer koncentráció értéket állapítottak meg. A tesztek egyetértésének jellemzésére Bland-Altman analízist végeztük, mellyel a koncentráció értékek közötti különbségeket és az átlagos értékek összefüggéseit vizsgáltuk. A Dia-D-DIMER és a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztet is a referens teszthez viszonyítottuk. Mindkét esetben hasonló átlagos eltérési értékeket kaptunk (0,43 és 0,47), a Dia-D-DIMER tesztnél a tesztek különbsége valamivel jobban eltért a nullától, mint a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di esetében ("limits of agreement" = -5,28-6,22; -3,56-4,43) A 20. és 21. ábrák alapján a megjelenített tesztek különbségének, illetve átlagának értékeire illesztett egyenes meredeksége a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di és a referens teszt között kisebb értéket adott, mint a Dia-D-DIMER tesztnél, következésképpen ennél az előbbi tesztpárnál a magasabb D-dimer koncentráció értékek esetén kisebb eltérést láttunk a két teszt között.

Ugyancsak ennek a két tesztpárnak az eredményeit hasonlítottuk össze lineáris regressziós analízist használva. A tesztek illeszkedését jellemző  $R^2$  érték a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di párnál magasabb értéket ( $R^2=0,8973$ ) adott, mint a Dia-D-DIMER teszt és a referens teszt esetében ( $R^2=0,7357$ ), mely valamivel jobb korrelációt tükröz.

A próbák közötti különbségeket számos – már a fentiekben említett – tényező okozhatja. A tesztek összehangolására felhasználói szinten ellenanyag, vagy konstrukció-változtatás szintjén természetesen már nincs lehetőség. A küszöbérték változtatásával lehetséges viszont a próbák pozitív-negatív eredményeinek finomhangolása. A két vizsgált próba küszöbértékét 0,2 és 1  $\mu\text{g/ml}$  FEU között változtattuk. A Khí-négyzet vizsgálat alapján azt tapasztaltuk, hogy a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di 0,3-1  $\mu\text{g/ml}$  FEU közötti küszöbértékek alkalmazásakor nem mutatott szignifikáns különbséget az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer teszthez képest, a pozitív-negatív eredmények tekintetében. A Dia-D-DIMER teszttel hasonlóképpen számolva, a 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  FEU közötti küszöbértékek alkalmazásakor nem volt szignifikáns a különbség a két teszt között.

A 8. táblázatban feltüntetett adatok egyértelműen jelzik, hogy a küszöbérték változtatásával jelentősen változnak a szenzitivitás és specificitás értékek is. Kisebb

küszöbértéket választva nő az érzékenység, mivel a negatív eredmények száma csökken, ellenben a hamis pozitívaké nőhet. Ezzel ellentétesen, ha a küszöbértéket növeljük, nagyobb specificitást érünk el, több hamis negatív, és kevesebb álpozitív esetet eredményez.

Kísérletet téve egy optimális küszöbérték megállapítására, az osztályozási pontosságot és a Youden indexet is kiszámoltuk. E mutatók eredményei szerint, a STA<sup>®</sup>-Liatest<sup>®</sup> D-Di tesztnél a 0,5-0,6 µg/ml FEU küszöbértékek, míg a Dia-D-DIMER tesztnél a 0,7 µg/ml FEU küszöbérték az, melyek a legjobban harmonizálnak az INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer esetében használt 0,5 µg/ml FEU küszöbértékkel.

Eredményeink alátámasztják a fent említett szakirodalomban is fellelhető ajánlásokat, melyek szerint bár általában 0,5 µg/ml FEU az „univerzális” D-dimer küszöbérték, mégis attól eltérő érték akár alkalmasabb döntési határértéknek bizonyulhat. Következésképpen minden laboratóriumnak meg kellene határoznia a vizsgált populációra és klinikai használatra (pl. VTE kizárására) alakított küszöbértékét az általa használt D-dimer tesztre. Ennek különös jelentősége van akkor, amikor a laboratórium egy új teszt használatára tér át.

## **6.2.2 A Dia-D-DIMER teszt kutyáktól származó mintákon való alkalmazása**

A Dia-D-DIMER tesztet alapvetően humán vérplazma minták D-dimer koncentrációjának mérésére fejlesztettük. Szakirodalmi eredményekre támaszkodva (Caldin és mtsai., 2000; Griffin és mtsai., 2003; Machida és mtsai., 2010; Stokol, 2003; Nelson és Andreasen, 2003). megkíséreltük kutyáktól származó vérplazma minták D-Dimer értékét is meghatározni. Vizsgálataink eredményei alátámasztják a fent említett közleményekben foglaltakat. Nevezetesen, hogy a humán vérplazma minták D-dimer koncentrációjának vizsgálatára alkalmazott próbák alkalmassá tehetők állatok mintáinak vizsgálatára is. Vizsgálataink során kiderült, hogy a 2B9 ellenanyagra épülő Dia-D-DIMER teszt is alkalmas kutya vérplazma minták D-dimer koncentrációjának mérésére.

## **D-dimer tesztek összehasonlítása kutya mintákon**

A kutyáktól származó mintákat a Dia-D-DIMER teszt mellett egy másik kereskedelmi forgalomban kapható D-dimer teszttel (INNOVANCE<sup>®</sup> D-Dimer) is lemértük. A két próba korrelációját Bland-Altman analízissel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a tesztek különbségét és átlagát jelző értékekre illesztett egyenes meredeksége nagyobb volt a kutya mintákon (1,0464), mint a korábban a humán mintákon kapott érték (0,7838), nagyobb eltérést

mutatva a nullától. Ellenben a kutya mintáknál az átlagos eltérés szórása kisebb volt, mint a humán minták esetében.

### **A D-dimer és tumorok összefüggései kutyákban**

Bár az emelkedett D-dimer érték utalhat thromboemboliára, daganatra, illetve műtétek, gyulladásos betegségek során is pozitív eredményt adhat (Morii és mtsai., 2008; Stokol, 2003), az állatgyógyászatban a D-dimer koncentráció meghatározását kutyák esetében elsősorban a tüdőembólia és a DIC diagnosztizálására alkalmazzák.

Vizsgálataink során különféle daganatos megbetegségben szenvedő kutyák esetében mértük meg a minta D-dimer értékét, és a klinikailag egészséges kutyákból álló kontroll csoporthoz viszonyítva vizsgáltuk a koncentráció eltéréseket.

A daganatos kutyák mintáinak vizsgálata arra enged következtetni, hogy a Dia-D-DIMER teszt használata hasznos támogató eszköz lehet kutyák egyes daganatos megbetegedéseinek diagnosztizálásában, ezenkívül fontos szerepe lehet a daganatok progressziójának a nyomon követésében is.

Eredményeink azt mutatják, hogy a daganatos kutyák csoportjában mért D-dimer koncentráció szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Ezek az eredmények összhangban vannak más, szakirodalomban fellelhető, főleg emberektől származó minták vizsgálati eredményeivel (Adamson és mtsai., 1993; Altıay és mtsai., 2007; Blackwell és mtsai., 2000; Dirix és mtsai., 2002; Gabazza és mtsai., 1993; Gadducci és mtsai., 1993; Khan és mtsai., 2007; Houry és mtsai., 2010; Kilic és mtsai., 2008; Morii és mtsai., 2008; Nagy és mtsai., 2012; Nakashima és mtsai., 1995).

Sajnos a kutyákkal kapcsolatban kevesebb ilyen közlemény található. Nelson és Andreasen neopláziás kutyák csoportját vizsgálva, 16 kutyából 7-nél találtak emelkedett D-dimer értéket. A neopláziás és kontroll csoportok közötti különbséget statisztikailag határértéket adó p értékkel ( $p=0,06$ ) tudták alátámasztani (Nelson és Andreasen, 2003). Egy másik közlemény arról számol be, hogy több betegcsoport párhuzamos vizsgálata során a neopláziás kutyák csoportjában kapták a legmagasabb D-dimer koncentráció középértéket (1,7 mg/l) – ami megegyezik a mi eredményeinkkel –, egyértelmű összefüggést állapítva meg az emelkedett D-dimer érték és neoplázia között (Dewhurst és mtsai., 2008).

A daganatokat kiindulási szövettípus alapján csoportosítva azt találtuk, hogy a rosszindulatú lymphoma, sarcoma, carcinoma daganatokkal terhelt ebek csoportjában szignifikánsan

magasabb D-dimer értékeket mértünk a kontroll csoporthoz képest. Ugyanakkor, az ugyancsak rosszindulatú mastocytoma daganattól szenvedő kutyák csoportjában nem találtunk szignifikáns eltérést. Érdekes, hogy a jóindulatú lipoma és insulinoma daganattípusok csoportjában az egészséges kutyák értékeivel közel azonosan alacsony volt a D-dimer koncentráció középértéke, de a kis esetszám miatt messzemenő következtetést az adatainkból nem lehet levonni.

Andreasen és munkatársai (2012) is foglalkoztak kutyák különböző daganattípusaival és megmérték az egyéb hemosztatikus paraméterek mellett a D-dimer koncentrációt is. A megvizsgált különböző daganatokban (carcinoma, sarcoma, mastocytoma, lymphoma) szenvedő beteg állatok D-dimer értékei között nem találtak különbséget. Tanulmányuk a daganatok progressziójának vizsgálatára is kiterjedt. Eredményeik azt mutatják, hogy a távoli áttétek esetén szignifikánsan megemelkedett a vér D-dimer koncentrációja, ugyanakkor a helyi invazív tumorok esetében mindez nem volt megfigyelhető.

Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy az áttét megjelenése, illetve a daganatok malignitása is megmutatkozik a D-dimer értékekben. Az egészséges kutyák csoportjához viszonyítva a malignus, illetve az áttétes daganatban szenvedő kutyák vérplazma mintáinak vizsgálata során szignifikánsan magasabb D-dimer értékeket kaptunk. Ugyanakkor a benignus elváltozásokkal diagnosztizált ebek esetében, nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Három esetben kiugróan magas, 15,1-28,2 µg/ml FEU közötti D-dimer értéket mértünk. Ezek közül az egyik, egy emlőcarcinomában szenvedő kutya, melynél mellüregi áttéteket találtak (Stádium 5), míg a másik kutyánál előrehaladott stádiumú lymphomát állapítottak meg (Stádium 4). A harmadik kutyánál epehólyag-carcinomát diagnosztizáltak, esetleges áttétről nem volt információnk. Hasonló következtetésre jutottak Morii és munkatársai (2008), amikor 77 daganatban szenvedő ember mintáit vizsgálták. Eredményeik szerint a D-dimer érték szignifikánsan magasabb volt a malignus tumorok esetében, mint a benignus tumoroknál (Morii és mtsai., 2008).

Napjainkban számos tanulmányban beszámolnak arról, hogy a plazma D-dimer koncentrációja és a daganatok progressziója (malignitási foka és stádiuma) között korreláció áll fenn (Batschauer és mtsai., 2010; Kwon és mtsai., 2008; Morii és mtsai., 2011). Következésképpen munkánk során mi is megvizsgáltuk a szövettani vizsgálatok alapján megállapított tumor malignitási fokot, illetve a stádiumot, mindazon daganatok esetében, melyeknél ez az adat rendelkezésünkre állt. A szakirodalomban szereplő adatokat eredményeink is alátámasztották. A magas malignitási fokú, valamint az előrehaladott stádiumú beteg kutyák esetében mi is emelkedett D-dimer koncentráció értékeket mértünk.



Az állatorvosi szakirodalomban a daganatos kutyák D-dimer mérésével kapcsolatban a specificitás és a szenzitivitás vonatkozásában sajnos nem találtunk közleményeket. Ugyanakkor mi vizsgálataink során megkíséreltük választ kapni ezekre a kérdésekre is. A 19. táblázatban feltüntetett adatok jelzik, hogy a küszöbérték változtatásával jelentősen változik a teszt szenzitivitása és specificitása. Vizsgálatainkban az egészségesnek vélt kutyák mintái alapján meghatározott referencia tartomány felső határa 0,69 µg/ml FEU volt, mely érték magasabbnak bizonyult a gyártó által a humán vénás thromboemboliás betegségek kizárására megadott 0,5 µg/ml FEU küszöbértéknél. Ezen küszöbérték mellett 33%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást értünk el, míg a PPV ugyancsak 100% volt. A magas specificitás miatt a Dia-D-DIMER teszttel a negatív eredményt mutató kutyák 100%-a valóban klinikailag egészséges volt. Ugyanakkor a teszt alacsony szenzitivitása miatt a daganattal diagnosztizált kutyáknál kisebb számban kaptunk pozitív eredményt.

További vizsgálatok indokoltak annak eldöntésére, hogy az emelkedett D-dimer koncentrációnak mekkora a diagnosztikai értéke kutyák és más állatfajok daganatos megbetegedéseinek kórjelzésében.

### **6.3 Konklúzió**

Az értekezés elején megfogalmazott célokat maradéktalanul sikerült megvalósítanunk. Sikeresen előállítottunk és széles körűen jellemeztünk egy olyan új, D-dimer specifikus monoklonális ellenanyagot, amely a keresztreakciók vizsgálatának eredményei szerint nem reagált a vérplazmában jelen lévő fibrinogénnel, továbbá a meghatározott epitóp felszínnek alapján, a latex agglutináción alapuló diagnosztikai tesztben való használatra alkalmasnak bizonyult. Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a D-dimer próbákat tárgyaló szakirodalomban az ellenanyag epitóp felismerő tulajdonságainak leírása ritkaságnak számít; továbbá az előállított ellenanyag felhasználásával egy klinikai teljesítményértékelésen átesett, CE minősített immunturbidimetriás tesztet fejlesztettünk ki, mely Dia-D-DIMER néven kereskedelmi forgalomba került.

Vizsgálatainkban az ellenanyag diagnosztikai alkalmazhatóságát, tágabb értelemben a kifejlesztett teszt gyakorlati felhasználását is értékeltük. Az emberektől származó minták vizsgálata során megállapítottuk, hogy a próba eredményei korrelációt mutatnak a kereskedelmi forgalomban kapható más D-dimer tesztek eredményeivel. A megfelelő küszöbérték megválasztásával kísérletet tettünk a tesztek összehangolására.

Az elsősorban humán minták vizsgálatára fejlesztett diagnosztikai próbát kutyáktól származó minták mérésére is alkalmasnak találtuk. Eredményeinket nemzetközi összehasonlításban is jelentős számú daganatban szenvedő kutya mintájának vizsgálatával támasztottuk alá.

Másokhoz hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy a malignus tumorok, illetve az előrehaladott állapotú, áttétet adó tumorok és az emelkedett D-dimer érték között összefüggés lehet. Ugyanakor további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a kutyák és más állatok D-dimer koncentráció mérésének milyen kiegészítő diagnosztikai jelentősége lehet, különös tekintettel az állatok sűjtő neopláziák felderítésében és a betegség előrehaladásának és a kezelés eredményességének monitorozásában.

## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Előállítottunk és jellemeztünk egy, a D-dimert specifikusan felismerő monoklonális ellenanyagot (2B9), amely a D-dimer felszínén egy új, eddig a szakirodalomban nem közölt térbeli epitópot ismer fel.
2. Azonosítottuk a D-domén B-láncán a 94 IQPDSS és 140 GNVANTNT aminosavakat, valamint a C-láncon a 23 LQEIYNSNNQ- és 93 VYCEID aminosavszekvencia szakaszokat.
3. Az előállított 2B9 ellenanyagot egy hazai fejlesztésű, új, immunturbidimetriás D-dimer diagnosztikai próbába építettük, amely Dia-D-DIMER néven, CE minősítéssel kereskedelmi forgalomba is került.
4. A Dia-D-DIMER teszt alkalmas az állatorvosi gyakorlatban is a kutyák thrombotikus folyamatokkal és egyes tumorokkal járó megbetegedéseinek vizsgálatára, illetve fontos szerepe lehet a daganatok esetleges klinikai progressziójának nyomonkövetésében is.

## 8 IRODALOMJEGYZÉK

- ACKERLY, I., KLIM, S., MCFARLANE, J. & KELLY, A. M. 2018. Diagnostic utility of an age-specific cut-off for d-dimer for pulmonary embolism assessment when used with various pulmonary embolism risk scores. *Internal Medicine Journal*, 48, 465-468.
- ADAM, S. S., KEY, N. S. & GREENBERG, C. S. 2009. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*, 113, 2878-87.
- ADAMSON, A. S., FRANCIS, J. L., WITHEROW, R. O. & SNELL, M. E. 1993. Coagulopathy in the prostate cancer patient: prevalence and clinical relevance. *Ann R Coll Surg Engl*, 75, 100-4.
- ALTIAY, G., CIFTCI, A., DEMIR, M., KOCAK, Z., SUT, N., TABAKOGLU, E., HATIPOGLU, O. N. & CAGLAR, T. 2007. High plasma D-dimer level is associated with decreased survival in patients with lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19, 494-8.
- ANDREASEN, E. B., TRANHOLM, M., WIINBERG, B., MARKUSSEN, B. & KRISTENSEN, A. T. 2012. Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Vet Scand*, 54, 3.
- BATSCHAUER, A. P. B., FIGUEIREDO, C. P., BUENO, E. C., RIBEIRO, M. A., DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A. P., GOMES, K. B. & CARVALHO, M. G. 2010. D-dimer as a possible prognostic marker of operable hormone receptor-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 21, 1267-1272.
- BEDARD, C., LANEVSCHI-PIETERSMA, A. & DUNN, M. 2007. Evaluation of coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol*, 36, 167-72.
- BLACKWELL, K., HAROON, Z., BROADWATER, G., BERRY, D., HARRIS, L., IGLEHART, J. D., DEWHIRST, M. & GREENBERG, C. 2000. Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. *J Clin Oncol*, 18, 600-8.
- BLAND, J. M. & ALTMAN, D. G. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*, 327, 307-310.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAZZELL, J. L. & BORJESSON, D. L. 2007. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol*, 36, 79-84.

- CALDIN, M., FURLANELLO, T. & LUBAS, G. 2000. Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet Clin Pathol*, 29, 51-54.
- CESARINI, C., MONREAL, L., ARMENGOU, L., DELGADO, M. A., RIOS, J. & JOSE-CUNILLERAS, E. 2010. Association of admission plasma D-dimer concentration with diagnosis and outcome in horses with colic. *J Vet Intern Med*, 24, 1490-7.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2011. Quantitative D-Dimer for the Exclusion of Venous Thromboembolic Disease: Approved Guideline CLSI Document H59-A. CLSI Wayne, PA.
- DEMPFLE, C.-E., ZIPS, S., ERGÜL, H., HEENE, D. L. & GROUP, F. S. 2001. The fibrin assay comparison trial (FACT). *Thrombosis and haemostasis*, 85, 671-678.
- DEMPFLE, C. E. 2005a. D-dimer testing and venous thromboembolism: four view points. *J Thromb Haemost*, 3, 377-9.
- DEMPFLE, C. E. 2005b. Validation, calibration, and specificity of quantitative D-dimer assays. *Seminars in vascular medicine*, 5, 315-320.
- DEMPFLE, C. E. 2006. D-dimer: standardization versus harmonization. *Thromb Haemost*, 95, 399-400.
- DEVINE, D. V. & GREENBERG, C. S. 1988. Monoclonal antibody to fibrin D-dimer (DD-3B6) recognizes an epitope on the gamma-chain of fragment D. *Am J Clin Pathol*, 89, 663-6.
- DEWHURST, E., CUE, S., CRAWFORD, E. & PAPASOULIOTIS, K. 2008. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric "Point-of-Care" test. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 344-348.
- DIRIX, L. Y., SALGADO, R., WEYTJENS, R., COLPAERT, C., BENOY, I., HUGET, P., VAN DAM, P., PROVE, A., LEMMENS, J. & VERMEULEN, P. 2002. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 86, 389-95.
- DOH, H.-J., KIM, D.-S. & CHUNG, K.-H. 2015. Monoclonal antibody against D-dimer and diagnosis agent for detecting D-dimer, crosslinked fibrin and its derivatives containing D-dimer by using the antibody. Google Patents.
- DOH, H. J., SONG, K. S., KANG, M. S., KIM, D. S., KIM, K. A., KANG, J., JANG, Y. & CHUNG, K. H. 2006. Novel monoclonal antibody that recognizes new neoantigenic determinant of D-dimer. *Thrombosis Research*, 118, 353-360.
- DOUMA, R. A., LE GAL, G., SOHNE, M., RIGHINI, M., KAMPHUISEN, P. W., PERRIER, A., KRUIP, M. J., BOUNAMEAUX, H., BULLER, H. R. & ROY, P. M. 2010. Potential of an age adjusted D-dimer cut-off value to improve the exclusion of

- pulmonary embolism in older patients: a retrospective analysis of three large cohorts. *BMJ*, 340, c1475.
- DUTTON, J., DACHSEL, M. & CRANE, R. 2018. Can the use of an age-adjusted D-dimer cut-off value help in our diagnosis of suspected pulmonary embolism? *Clinical Medicine*, 18, 293.
- EDMAN, P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chem. scand*, 4, 283-293.
- EL-ZAHAR, H., BAYOUMI, Y., SHALABY, S., GEHLEN, H. & SHETY, T. 2018. Plasma d-dimer concentration in horses with colic. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 6, 27-32.
- ELMS, M., BUNCE, I., BUNDESEN, P., RYLATT, D., WEBBER, A., MASCI, P. & WHITAKER, A. 1983. Measurement of crosslinked fibrin degradation products—an immunoassay using monoclonal antibodies. *Thrombosis and haemostasis*, 49, 591-594.
- ELMS, M. J., BUNCE, I. H., BUNDESEN, P. G., RYLATT, D. B., WEBBER, A. J., MASCI, P. P. & WHITAKER, A. N. 1986. Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. *Am J Clin Pathol*, 85, 360-4.
- EPSTEIN, S. E., HOPPER, K., MELLEMA, M. S. & JOHNSON, L. R. 2013. Diagnostic utility of D-dimer concentrations in dogs with pulmonary embolism. *J Vet Intern Med*, 27, 1646-9.
- ERDEI, A. 2006. *Immunológiai módszerek*, Budapest, Medicina Könyvkiadó.
- FAVRESSE, J., LIPPI, G., ROY, P. M., CHATELAIN, B., JACQMIN, H., TEN CATE, H. & MULLIER, F. 2018. D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 55, 548-577.
- FAZEKASNÉ KIS, M. 2002. ROC analízis alkalmazása. *Acta Agraria Debreceniensis*, 4-7.
- FONYÓ, A. 1997. *Az orvosi élettan tankönyve*, Budapest, Medicina Könyvkiadó.
- FRANCIS, C. W., MARDER, V. J. & BARLOW, G. H. 1980. Plasmic degradation of crosslinked fibrin: characterization of new macromolecular soluble complexes and a model of their structure. *The Journal of clinical investigation*, 66, 1033-1043.
- GABAZZA, E. C., TAGUCHI, O., YAMAKAMI, T., MACHISHI, M., IBATA, H. & SUZUKI, S. 1993. Evaluating prethrombotic state in lung cancer using molecular markers. *Chest*, 103, 196-200.
- GADDUCCI, A., BAICCHI, U., MARRAI, R., FACCHINI, V., DEL BRAVO, B., FOSELLA, P. V. & FIORETTI, P. 1993. Pretreatment plasma levels of fibrinopeptide-A (FPA), D-dimer (DD), and von Willebrand factor (vWF) in patients

with operable cervical cancer: influence of surgical-pathological stage, tumor size, histologic type, and lymph node status. *Gynecol Oncol*, 49, 354-8.

GAFFNEY, P. J. 1972. FDP. *Lancet* 2, 1422-1422.

GAFFNEY, P. J. 1973. Subunit relationships between fibrinogen and fibrin degradation products. *Thrombosis Research*, 2, 201-217.

GAFFNEY, P. J., LANE, D. A., KAKKAR, V. V. & BRASHER, M. 1975. Characterisation of a soluble D dimer-E complex in crosslinked fibrin digests. *Thromb Res*, 7, 89-99.

GERGELY, J. & ERDEI, A. 2000. *Immunbiológia* Budapest, Medicina Könyvkiadó.

GIANNOULOPOULOS, G. D., ATHANASIOU, L. V. & POLIZOPOULOU, Z. S. 2010. D-dimer as a diagnostic tool for canine thromboembolic disorders. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61, 49-56.

GREENBERG, C. S., DEVINE, D. V. & MCCRAE, K. M. 1987. Measurement of plasma fibrin D-dimer levels with the use of a monoclonal antibody coupled to latex beads. *Am J Clin Pathol*, 87, 94-100.

GRIFFIN, A., CALLAN, M. B., SHOFER, F. S. & GIGER, U. 2003. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am J Vet Res*, 64, 1562-9.

HAGER, K. & PLATT, D. 1995. Fibrin degeneration product concentrations (D-dimers) in the course of ageing. *Gerontology*, 41, 159-65.

HART, R., BATE, I., DINH, D., ELMS, M., BUNDESEN, P., HILLYARD, C. & RYLATT, D. B. 1994. The Detection of D-Dimer in Plasma by Enzyme-Immunoassay - Improved Discrimination Is Obtained with a More Specific Signal Antibody. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5, 227-232.

HARTMANN, K. 2005. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 35, 39-79, vi.

HOLCZER, T., NAGY, B., LOSONCZI, B. & VÁSÁRHELYI, B. 2016. Comparison of routine hemostasis test results obtained by CoagXL with those of Siemens BCS XP in a university lab: P10. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54.

JACONELLI, T., ERAGAT, M. & CRANE, S. 2018. Can an age-adjusted D-dimer level be adopted in managing venous thromboembolism in the emergency department? A retrospective cohort study. *European Journal of Emergency Medicine*, 25, 288-294.

JENNINGS, I., WOODS, T. A., KITCHEN, D. P., KITCHEN, S. & WALKER, I. D. 2007. Laboratory D-dimer measurement: improved agreement between methods through calibration. *Thromb Haemost*, 98, 1127-35.

- KANG, M. H., HEO, R. Y. & PARK, H. M. 2016. Evaluation of D-Dimer Concentrations in Clinically Ill Dogs with High Risk of Thromboembolic Disease. *Pakistan Veterinary Journal*, 36, 219-223.
- KELLY, W. J. & SCHINDLER, S. T. 1998. *MSD orvosi kézikönyv a családban* Budapest, Melania Kiadó.
- KHAN, M. Z., KHAN, M. S., RAZIQ, F. & KHATTAK, A. M. 2007. Fibrinogen Degradation Products and D-Dimers in Patients with Breast Carcinoma. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 5, 9-12.
- KHOURY, J. D., ADCOCK, D. M., CHAN, F., SYMANOWSKI, J. T., TIEFENBACHER, S., GOODMAN, O., PAZ, L., MA, Y., WARD, D. C., VOGELZANG, N. J. & FINK, L. M. 2010. Increases in quantitative D-dimer levels correlate with progressive disease better than circulating tumor cell counts in patients with refractory prostate cancer. *Am J Clin Pathol*, 134, 964-9.
- KILIC, M., YOLDAS, O., KESKEK, M., ERTAN, T., TEZ, M., GOCMEN, E. & KOC, M. 2008. Prognostic value of plasma D-dimer levels in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 10, 238-41.
- KIM, T.-Y. 2014. Evaluation of Plasma D-dimer Concentration in Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Clinics*, 31, 85.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-7.
- KRICKA, L. J. 1999. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical chemistry*, 45, 942-956.
- KWON, H. C., OH, S. Y., LEE, S., KIM, S. H., HAN, J. Y., KOH, R. Y., KIM, M. C. & KIM, H. J. 2008. Plasma levels of prothrombin fragment F1+2, D-dimer and prothrombin time correlate with clinical stage and lymph node metastasis in operable gastric cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*, 38, 2-7.
- LI, F., VIJAYASANKARAN, N., SHEN, A. Y., KISS, R. & AMANULLAH, A. 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*, 2, 466-79.
- LINKINS, L. A. & TAKACH LAPNER, S. 2017. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *Int J Lab Hematol*, 39 Suppl 1, 98-103.
- LIPPI, G., TRIPODI, A., SIMUNDIC, A.-M. & FAVALORO, E. J. International survey on D-dimer test reporting: a call for standardization. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 2015. Thieme Medical Publishers, 287-293.
- LITTLE, M., KIPRIYANOV, S. M., LE GALL, F. & MOLDENHAUER, G. 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today*, 21, 364-70.



- LIU, J. K. 2014. The history of monoclonal antibody development—progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3, 113-116.
- LONGSTAFF, C., ADCOCK, D., OLSON, J. D., JENNINGS, I., KITCHEN, S., MUTCH, N., MEIJER, P., FAVALORO, E. J., LIPPI, G. & THACHIL, J. 2016. Harmonisation of D-dimer—A call for action. *Thrombosis research*, 137, 219-220.
- MACHIDA, T., KOKUBU, H., MATSUDA, K., MIYOSHI, K. & UCHIDA, E. 2010. Clinical use of D-dimer measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. *J Vet Med Sci*, 72, 1301-6.
- MAGYAR, I. & PETRÁNYI, G. 1974. *A belgyógyászat alapvonalai 2.*
- MEIJER, P., HAVERKATE, F., KLUFT, C., DE MOERLOOSE, P., VERBRUGGEN, B. & SPANNAGL, M. 2006. A model for the harmonisation of test results of different quantitative D-dimer methods. *Thromb Haemost*, 95, 567-72.
- MICHIELS, J. J., SCHROYENS, W., DE BACKER, W., VAN DER PLANKEN, M., HOOGSTEDEN, H. & PATTYNAMA, P. M. I. 2003. Non-invasive exclusion and diagnosis of pulmonary embolism by sequential use of the rapid ELISA D-dimer assay, clinical score and spiral CT. *International Angiology*, 22, 1-14.
- MISETA, I. 2003. *Önellőrző gyorsesztek: diagnosztika a beteg kezében* [Online]. Elérhető: [http://www.pharmaonline.hu/cikk/onellenorzo\\_gyorstesztekek\\_diagnosztika\\_a\\_beteg\\_kezeben](http://www.pharmaonline.hu/cikk/onellenorzo_gyorstesztekek_diagnosztika_a_beteg_kezeben) [Letöltve: 2020.04.02.].
- MOLINA-BOLIVAR, J. A. & GALISTEO-GONZALEZ, F. 2005. Latex immunoagglutination assays. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*, C45, 59-98.
- MORII, T., MOCHIZUKI, K., KOTERA, M., IMAKIIRE, N., MORIWAKI, T. & SATOMI, K. 2008. Perioperative d-dimer levels in patients with musculoskeletal tumors. *Open Orthop J*, 2, 130-2.
- MORII, T., MOCHIZUKI, K., TAJIMA, T., ICHIMURA, S. & SATOMI, K. 2011. D-dimer levels as a prognostic factor for determining oncological outcomes in musculoskeletal sarcoma. *Bmc Musculoskeletal Disorders*, 12, 250.
- MULLIER, F., VANPEE, D., JAMART, J., DUBUC, E., BAILLY, N., DOUXFILS, J., CHATELAIN, C., DOGNE, J. M. & CHATELAIN, B. 2014. Comparison of five D-dimer reagents and application of an age-adjusted cut-off for the diagnosis of venous thromboembolism in emergency department. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 25, 309-15.
- NAGY, Z., HORVATH, O., KADAS, J., VALTINYI, D., LASZLO, L., KOPPER, B. & BLASKO, G. 2012. D-dimer as a potential prognostic marker. *Pathol Oncol Res*, 18, 669-74.

- NAKASHIMA, J., TACHIBANA, M., UENO, M., BABA, S. & TAZAKI, H. 1995. Tumor necrosis factor and coagulopathy in patients with prostate cancer. *Cancer Res*, 55, 4881-5.
- NELSON, C. M., WRIGHT, G. S., SILBAUGH, T. R. & COTA, L. J. 2009. Improving D-dimer Positive Predictive Value for Outpatients with Suspected Deep Vein Thrombosis. *Perm J*, 13, 4-7.
- NELSON, O. L. & ANDREASEN, C. 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med*, 17, 830-4.
- NIEUWENHUIZEN, W. 1997. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*, 77, 1031-3.
- NYBO, M. & HVAS, A. M. 2017. Age-adjusted D-dimer cut-off in the diagnostic strategy for deep vein thrombosis: a systematic review. *Scand J Clin Lab Invest*, 77, 568-573.
- OLSON, J. D., CUNNINGHAM, M. T., HIGGINS, R. A., EBY, C. S. & BRANDT, J. T. 2013. D-dimer: simple test, tough problems. *Arch Pathol Lab Med*, 137, 1030-8.
- PARRY, B. A., CHANG, A. M., SCHELLONG, S. M., HOUSE, S. L., FERMAN, G. J., DEADMON, E. K., GIORDANO, N. J., CHANG, Y. C., COHEN, J., ROBAK, N., SINGER, A. J., MULROW, M., REIBLING, E. T., FRANCIS, S., GRIFFIN, S. M., PROCHASKA, J. H., DAVIS, B., MCNELIS, P., DELGADO, J., KUMPERS, P., WERNER, N., GENTILE, N. T., ZESERSON, E., WILD, P. S., LIMKAKENG, A. T., WALTERS, E. L., LOVECCHIO, F., THEODORO, D., HOLLANDER, J. E. & KABRHEL, C. 2018. International, multicenter evaluation of a new D-dimer assay for the exclusion of venous thromboembolism using standard and age-adjusted cut-offs. *Thrombosis Research*, 166, 63-70.
- PINCZÉS, I. & SPEER, G. 2009. A D-dimer-szint meghatározásának jelentősége a klinikai gyakorlatban. *Lege Artis Medicinae*, 19, 761-767.
- PITTET, J. L., DE MOERLOOSE, P., REBER, G., DURAND, C., VILLARD, C., PIGA, N., ROLLAND, D., COMBY, S. & DUPUY, G. 1996. VIDAS D-dimer: fast quantitative ELISA for measuring D-dimer in plasma. *Clin Chem*, 42, 410-5.
- REBER, G. & MOERLOOSE, P. D. 2013. Standardization of D-dimer Testing. *Quality in laboratory hemostasis and thrombosis*, 136-146.
- RIGHINI, M., PERRIER, A., DE MOERLOOSE, P. & BOUNAMEAUX, H. 2008. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost*, 6, 1059-71.
- RIGHINI, M., VAN ES, J., DEN EXTER, P. L., ROY, P. M., VERSCHUREN, F., GHUYSEN, A., RUTSCHMANN, O. T., SANCHEZ, O., JAFFRELOT, M., TRINH-DUC, A., LE GALL, C., MOUSTAFA, F., PRINCIPE, A., VAN HOUTEN, A. A., TEN WOLDE, M., DOUMA, R. A., HAZELAAR, G., ERKENS, P. M., VAN

- KRALINGEN, K. W., GROOTENBOERS, M. J., DURIAN, M. F., CHEUNG, Y. W., MEYER, G., BOUNAMEAUX, H., HUISMAN, M. V., KAMPHUISEN, P. W. & LE GAL, G. 2014. Age-adjusted D-dimer cutoff levels to rule out pulmonary embolism: the ADJUST-PE study. *JAMA*, 311, 1117-24.
- RILEY, R. S., GILBERT, A. R., DALTON, J. B., PAI, S. & MCPHERSON, R. A. 2016. Widely Used Types and Clinical Applications of D-Dimer Assay. *Lab Med*, 47, 90-102.
- ROBIER, C., EDLER, E., KLESCHER, D. & NEUBAUER, M. 2014. False-positive D-dimer result in a latex-enhanced immunoassay caused by interfering human anti-mouse antibodies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52, e253-e255.
- RYLATT, D. B., BLAKE, A. S., COTTIS, L. E., MASSINGHAM, D. A., FLETCHER, W. A., MASCI, P. P., WHITAKER, A. N., ELMS, M., BUNCE, I., WEBBER, A. J., WYATT, D. & BUNDESEN, P. G. 1983. An Immunoassay for Human D-Dimer Using Monoclonal-Antibodies. *Thrombosis Research*, 31, 767-778.
- SANDHOLM, M., VIDOVIC, A., PUOTUNEN-REINERT, A., SANKARI, S., NYHOLM, K. & RITA, H. 1995. D-dimer improves the prognostic value of combined clinical and laboratory data in equine gastrointestinal colic. *Acta Vet Scand*, 36, 255-72.
- SCHWABER, J. & COHEN, E. P. 1973. Human $\times$  mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature*, 244, 444-447.
- SEGAL, J. B., ENG, J., TAMARIZ, L. J. & BASS, E. B. 2007. Review of the evidence on diagnosis of deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Ann Fam Med*, 5, 63-73.
- SHEELE, J. M., TANG, A., FARHAN, O. & MORRIS, N. 2018. A retrospective evaluation of the age-adjusted D-dimer versus the conventional D-dimer for pulmonary embolism. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 29, 344-349.
- SPANNAGL, M., HAVERKATE, F., REINAUER, H. & MEIJER, P. 2005. The performance of quantitative D-dimer assays in laboratory routine. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 16, 439-43.
- STEGNAR, M. & BOZIC, M. 2008. Determination of D-dimer by different quantitative assays-A harmonization exercise. *Biochemia Medica*, 18, 216-223.
- STEIN, P. D., HULL, R. D., PATEL, K. C., OLSON, R. E., GHALI, W. A., BRANT, R., BIEL, R. K., BHARADIA, V. & KALRA, N. K. 2004. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Annals of internal medicine*, 140, 589-602.
- STOKOL, T. 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33, 1419-35.

- STOKOL, T., BROOKS, M., RUSH, J. E., RISHNIW, M., ERB, H., ROZANSKI, E., KRAUS, M. S. & GELZER, A. R. 2008. Hypercoagulability in cats with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, 22, 546-52.
- STOKOL, T., BROOKS, M. B., ERB, H. N. & MAULDIN, G. E. 2000. D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am J Vet Res*, 61, 393-8.
- SZECSI, P. B., JORGENSEN, M., KLAJNBARD, A., ANDERSEN, M. R., COLOV, N. P. & STENDER, S. 2010. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost*, 103, 718-27.
- TEN CATE-HOEK, A. & PRINS, M. 2005. Management studies using a combination of D-dimer test result and clinical probability to rule out venous thromboembolism: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 2465-2470.
- THOLEN, I., WEINGART, C. & KOHN, B. 2009. Concentration of D-dimers in healthy cats and sick cats with and without disseminated intravascular coagulation (DIC). *J Feline Med Surg*, 11, 842-6.
- TICK, L. W., NIJKEUTER, M., KRAMER, M. H., HOVENS, M. M., BULLER, H. R., LEEBEEK, F. W., HUISMAN, M. V. & CHRISTOPHER STUDY, I. 2008. High D-dimer levels increase the likelihood of pulmonary embolism. *J Intern Med*, 264, 195-200.
- TUKEY, J. W. 1977. Exploratory Data Analysis Addison-Wesley. *Reading*, 688.
- VAN DER GRAAF, F., VAN DEN BORNE, H., VAN DER KOLK, M., DE WILD, P. J., JANSSEN, G. W. & VAN UUM, S. H. 2000. Exclusion of deep venous thrombosis with D-dimer testing--comparison of 13 D-dimer methods in 99 outpatients suspected of deep venous thrombosis using venography as reference standard. *Thromb Haemost*, 83, 191-8.
- VANDENBROUCKE, J. P., ROSING, J., BLOEMENKAMP, K. W., MIDDELDORP, S., HELMERHORST, F. M., BOUMA, B. N. & ROSENDAAL, F. R. 2001. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med*, 344, 1527-35.
- WADA, H., MATSUMOTO, T. & YAMASHITA, Y. 2014. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care*, 2, 15.
- WELLS, P. S. 2007. Integrated strategies for the diagnosis of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 41-50.
- WELLS, P. S., ANDERSON, D. R., RODGER, M., GINSBERG, J. S., KEARON, C., GENT, M., TURPIE, A. G., BORMANIS, J., WEITZ, J., CHAMBERLAIN, M., BOWIE, D., BARNES, D. & HIRSH, J. 2000. Derivation of a simple clinical model to categorize patients probability of pulmonary embolism: increasing the models utility with the SimpliRED D-dimer. *Thromb Haemost*, 83, 416-20.

- WHITAKER, A. N., ELMS, M. J., MASCI, P. P., BUNDESEN, P. G., RYLATT, D. B., WEBBER, A. J. & BUNCE, I. H. 1984. Measurement of cross linked fibrin derivatives in plasma: an immunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Pathol*, 37, 882-7.
- WICKRAMATHILAKA, M. P. & TAO, B. Y. 2019. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. *J Biol Eng*, 13, 63.
- WYLIE, F. G. & WALSH, T. P. 1997. Partial identification of the epitope on D-dimer for monoclonal antibody, DD-3B6/22. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 8, 87-96.
- ZWEIG, M. H. & CAMPBELL, G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical chemistry*, 39, 561-577.

## 9 A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

### 9.1 Lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk (szakcikkek)

TÖRÖK-NAGY, B., ANTAL, J. & DÉNES, B. 2019. Generation and characterization of D-dimer specific monoclonal antibodies for use in latex agglutination test. *PLoS One*, 14, e0212104. IF (2018-2019): 2.776

TÖRÖK-NAGY, B., VAJDA, Z. & VÁSÁRHELYI, B. 2019. Kereskedelmi forgalomban használt D-dimer-tesztek vágóértékének harmonizálása. *Orvosi Hetilap*, 160, 585-592. IF (2018): 0.564

TÖRÖK-NAGY, B., VAJDOVICH, P., BALOGH, L., THURÓCZY, J. & DÉNES, B. 2020. Evaluation of a human D-dimer test for use in plasma samples of dogs with neoplasia. *Acta Veterinaria Hungarica* [közlésre elfogadva] IF (2018): 1.059

### 9.2 Konferencia prezentációk

NAGY, B., KERN, A., ANTAL, J., VAJDA, Z. & DÉNES, B. D-dimer specifikus monoklonális ellenanyagok előállítása és jellemzése. Akadémiai beszámolók –előadás, 2013.

NAGY, B., KUIK, Á., VAJDOVICH, P. & DÉNES, B. D-dimer specifikus monoklonális ellenanyag alkalmazása immunturbidimetrián alapuló diagnosztikai tesztben. Akadémiai beszámolók –előadás, 2014.

NAGY, B., KUIK, Á., SZÉN, L., VAJDA, Z. & DÉNES, B. Tapasztalatok az új Dia-D-DIMER teszttel. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 57. Nagygyűlése, Nyíregyháza, 2014.

NAGY, B., KUIK, Á., SZÉN, L., VAJDA, Z. & DÉNES, B.: Saját előállítású D-Dimer diagnosztikai teszt jellemzése. Akadémiai beszámolók –előadás, 2015.

### 9.3 A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája

GYURANECZ, M., KREIZINGER, Zs., HORVÁTH, G., RÓNAI, Zs., DÁN, Á., NAGY, B., SZEREDI, L., MAKRAI, L., JÁNOSI, SZ., HAJTÓS, I., MAGYAR, T., BHIDE, M., ERDÉLYI, K. & DÉNES B. 2013. Natural IS711 insertion causing omp31gene inactivation in *Brucella ovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 234–238.

ANTAL, J., VAJDA, Z., TAKATSY, Zs. & NAGY, B. Procedure for biphasic preparation of liposomes and application thereof in manufacturing diagnostic reagents. Kiadási szám: US9506103 BZ Közzététel dátuma: 2016.11.29.

## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Dénes Bélának és asszisztensének, Gáspárné Stoll Annamáriának szeretném megköszönni a sok segítséget, támogatást, az ellenanyag előállításával kapcsolatos gyakorlati tudás átadását.

Külön köszönet illeti Dr. Vajda Zoltánt, aki szakmailag és emberileg is végig támogatott, biztatott a munkám során, illetve a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségért is nagyon hálás vagyok.

Hálás vagyok és szeretném megköszönni Dr. Antal Józsefnek a folyamatos szakmai támogatását és a lektori munkáját.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Diagon Kft. vezetőjének Dr. Kern Józsefnek, aki elindított ezen az úton és biztosította a munkához szükséges háttérrel. Ezúton szeretném megköszönni kollégáimnak, akik nem csak támogattak, de részt vettek és segítettek is munkámat: elsősorban Dr. Kuik Árpádnak és Kadarkuti Péternek, továbbá Bányász Borbálának, Kuruczné Dr. Kern Anitának, Jancsó Anitának, Kiss Erikának, Kovács Ágnesnek, Bene Alexandrának, Nemes Lillának, Buhaláné Sándor Erzsébetnek, Szilágyi Gábornénak (Icának) és Császár Gergőnek.

Köszönöm továbbá a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság egykori vezetőjének Dr. Tekes Lajosnak, valamint jelenlegi igazgatójának Dr. Abonyi Tamásnak, hogy biztosították a doktori munkámhoz elengedhetetlenül szükséges monoklonális ellenanyag előállításának szakmai és laboratóriumi háttérét.

Köszönettel tartozom Dr. Vásárhelyi Barnának, aki lehetőséget adott, hogy a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében a kutatói munka gyakorlati méréseit elvégezhessem, és hálás vagyok szakmai támogatásáért.

A mintagyűjtésben nyújtott segítségért és szakmai támogatásért köszönettel tartozom Dr. Vajdovich Péternek és Dr. Balogh Lajosnak.

Minden egyéb segítséget és támogatást a Családomnak, elsősorban Édesanyámnak és a Férjemnek, illetve a Barátaimnak köszönök meg.

## 11 MELLÉKLETEK

1. melléklet. Az alkalmazott oltóanyagok összetétele Balb/c AnN Crl BR egerek immunizálása során

Egér sorszám	Immunizálásnál használt szuszpenzió összetétel	24 nap elteltével megismételt oltásnál használt szuszpenzió összetétel	Oltás módja
1.	100 µl antigén + 100 µl CFA	100 µl antigén + 100 µl IFA	i.p.
2.	100 µl antigén + 100 µl CFA	100 µl antigén + 100 µl IFA	s.c.
3.	50 µl antigén + 50 µl PBS + 100 µl CFA	50 µl antigén + 50 µl PBS + 100 µl IFA	i.p.
4.	50 µl antigén + 50 µl PBS + 100 µl CFA	50 µl antigén + 50 µl PBS + 100 µl IFA	s.c.
5.	25 µl antigén + 25 µl PBS + 100 µl CFA	25 µl antigén + 25 µl PBS + 100 µl IFA	i.p.
6.	25 µl antigén + 25 µl PBS + 100 µl CFA	25 µl antigén + 25 µl PBS + 100 µl IFA	s.c.

Magyarázat: Antigén: D-dimer (1 mg/ml); CFA: komplett Freund-adjuváns; PBS: phosphate pufferelt sóoldat; IFA: inkomplett Freund-adjuváns; i.p.: intraperitoneális injekció; s.c.: subcutan injekció



2. melléklet. A vizsgált daganatos kutyák adatai

Daganat típus	Fajta	Nem	Kor	Metastasis	Malignitási fok	Stádium
Mastocytoma	Pincher	Kan	1,5	Nincs	1	1
Mastocytoma	Fox terrier	Kan	14	Nincs	2	1
Mastocytoma	Keverék	Kan	13	Nincs	2	1
Mastocytoma	Keverék	Szuka	5,5	Nincs	2	3
Mastocytoma	Boxer	Szuka	3,5	Nincs	2	1
Mastocytoma	Amerikai Staffordshire terrier	Kan	6	Nincs	2	3
Lymphoma	Beagle	Szuka	11	Nincs	1	1
Lymphoma	Keverék	Szuka	7	Nincs	1	2
Lymphoma	Keverék	Kan	10	Nincs	2	5
Lymphoma	Keverék	Kan	13	Nincs	3	5
Lymphoma	Argentín dog	Kan	8	Van	2	4
Sarcoma	Ír szetter	Kan	7	Nincs	1	1
Sarcoma	Német juhász	Kan	6,5	Nincs	1	2
Sarcoma	Francia bulldog	Szuka	9	Nincs	2	2
Sarcoma	Boxer	Kan	9	Nincs	3	3
Sarcoma	Akita	Szuka	10	Nincs	2	3
Sarcoma	Keverék	Kan	8	Nincs	1	1
Sarcoma	Keverék	Kan	11	Nincs	1	1
Sarcoma	Angol szetter	Kan	12	Nincs	3	1
Sarcoma	Pitbull terrier	Szuka	10	Nincs	1	1
Sarcoma	Bernáthegy	Szuka	11	Nincs	1	1
Carcinoma	Fox terrier	Szuka	12	Van	3	4
Carcinoma	Puli	Szuka	8	Van	2	4
Carcinoma	Dobermann	Kan	8	Van	3	3

Daganat típus	Fajta	Nem	Kor	Metastasis	Malignitási fok	Stádium
Carcinoma	Keverék	Szuka	6	Van	3	5
Carcinoma	Poodle	Szuka	10	Nincs	2	2
Carcinoma	Labrador retriever	Kan	8	Nincs	2	2
Carcinoma	Keverék	Kan	12	Nincs	2	3
Carcinoma	Puli	Kan	8	Nincs	2	4
Carcinoma	Keverék	Kan	10	Nincs	2	2
Carcinoma	Keverék	Szuka	7,5	Nincs	2	2
Carcinoma	Keverék	Kan	13	Nincs	2	3
Carcinoma	Francia bulldog	Kan	10	Nincs	2	4
Carcinoma	Rottweiler	Kan	8	Nincs	1	4
Carcinoma	Yorkshire terrier	Szuka	9	Nincs	1	2
Carcinoma	Golden retriever	Szuka	6	Nincs	3	3
Carcinoma	Bichon Havanese	Kan	11	Nincs	3	4
Carcinoma	Francia bulldog	Szuka	7	Nincs	1	1
Leukemia	Staffordshire terrier	Kan	4,5	Nincs	2	2
Insulinoma	Keverék	Kan	8	Nincs	1	2
Insulinoma	Keverék	Kan	9	Nincs	1	2
Insulinoma	Keverék	Szuka	12	Van	2	3
Lipoma	Labrador retriever	Szuka	9	Nincs	1	1
Lipoma	Havanese	Szuka	12	Nincs	1	1
Lipoma	Keverék	Szuka	11	Nincs	1	1
Adenoma	Keverék	Szuka	10	Nincs	1	1
Adenoma	Keverék	Kan	12	Nincs	1	1
Adenoma	Yorkshire terrier	Szuka	9,5	Nincs	1	1
Benigus kevert tumor	Yorkshire terrier	Szuka	9	Nincs	1	1
Papilloma	West-highland-white terrier	Kan	11	Nincs	1	1