

IgE mediált allergiák diagnosztikája - áttekintés

Szabó Zsófia
MH-EK Honvédkórház, KLDO,
Klinikai Immunológiai Részleg



Allergia vizsgálat jelentősége

- Az allergiás betegségek prevalenciája folyamatosan emelkedik világszerte – fejlődő országokban is!

Átfogó allergia prevalencia adatok a világban :

- Az emberek 30-50 %-ának van atópiás hajlama ; több, mint 50 %-uk szenzitizált legalább egy allergénnel.
- Allergiás rinitisz : 3/4 - 35 % között
- Allergiás asztma : 1 – 15 % között (legalább 300 millióan)
- Napi > 500 haláleset (óránként egy az EU-ban)
- Atópiás dermatitisz és kontakt allergiák : 20 %- ig

Prof. Dr. Nékám Kristóf 2012.

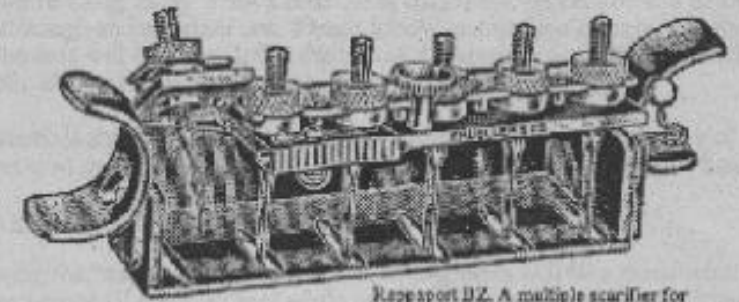


Allergia: népegészségügyi probléma Magyarországon is!

Történeti áttekintés

Vizsgálták, még nem tudták mit:

- 1867/73 Charles Blackley – első allergia bőr teszt: megkarcolta a bőrfelszínt, pollent helyezett a karcolásba
- 1908 Mantoux leírta az intradermális próbát, melyet később használtak allergia vizsgálatra
- 1920 Lewis és Grant leírták a Prick tesztet



Kappasot H.Z. A multiple scarifier for allergic tests. *J Allergy* 1931;2:379-80.

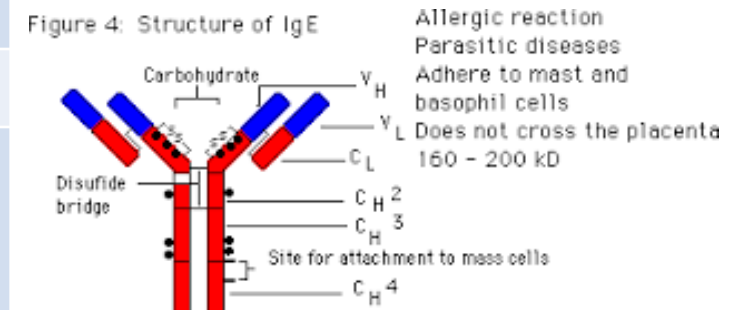
Jl of Allergy. 1931;2:379-80.

„Megvilágosodás kora”:

- 1966 Ishizaka: „reagin antibody” később: IgE
- 1969 Bennich: myeloma proteinek – fizikokémiai tulajdonságok **lehetőség total és allergén specifikus IgE tesztek kidolgozására**



Nehézlánc	ϵ
molekula	E2L2
molekulatömeg	190 000
Szénhidrát %	18
Komplement kötés (klasszikus)	nincs
Szérumban felezési idő	1-5 nap
Placentan való átjutás	nincs
Reagin aktivitás	4+, Fc tart. Fragment akadályozza a natív IgE bőr szenzitizáló hatását, Fab tartalmú nem



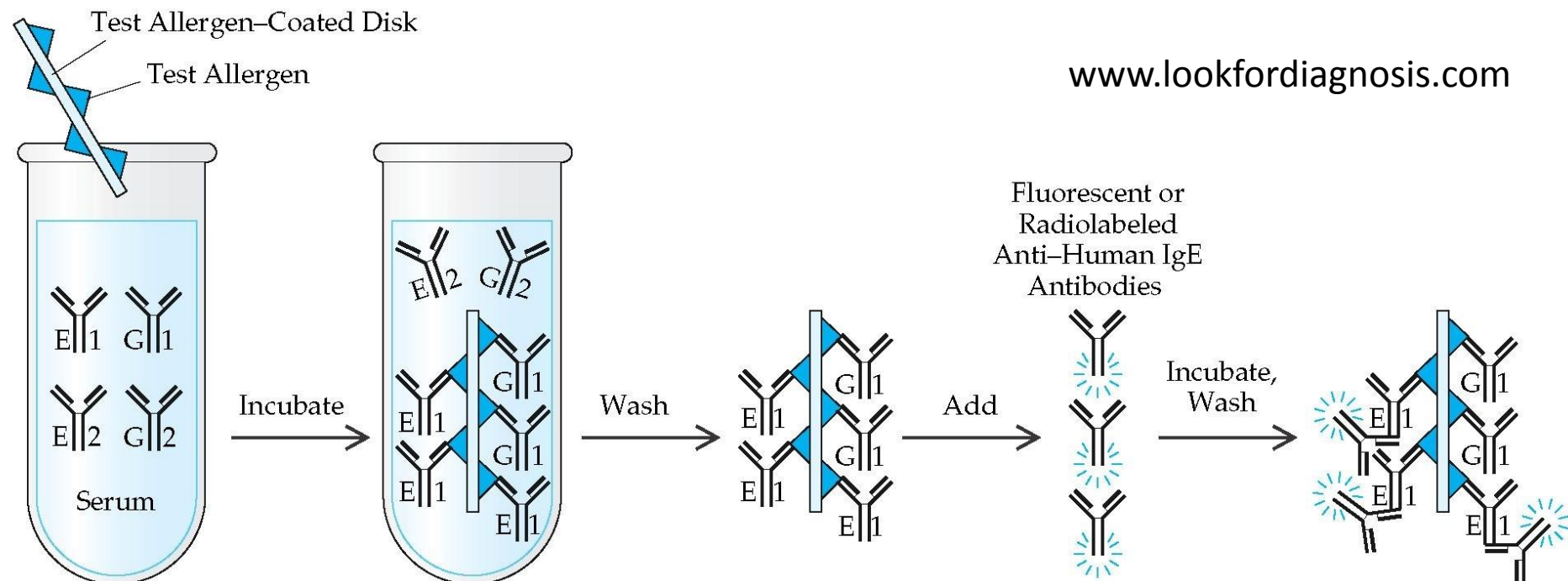
P. Brock Williams, Children's Mery Hospital (ACAAI) 2013 és McPherson, Pincus Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 2011 alapján

„Tündöklés”:

- 1967 Wide et al. Lancet: első allergén specifikus IgE teszt leírása:

RAST: **r**adio**a**llergo**s**orbent **t**est – mai tesztek nagy részénél helytelen a „RAST” használata!

- 1974 Pharmacia bevezette a piacra a PRIST (t-IgE) és RAST (s-IgE) teszteket



- Első klinikailag használt RAST a heterolog interpolációs sémát alkalmazta: minden allergen-specifikus IgE értéket arról a standard görbéről olvastak le, melyet nyír pollen specifikus IgE –t tartalmazó szérummal készítettek.
- Azért, hogy az eredményeket osztályozni lehessen, kalibrációs görbét önkényesen 4 részre osztották. (később módosították: érzékenység nőtt, specificitás csökkent)

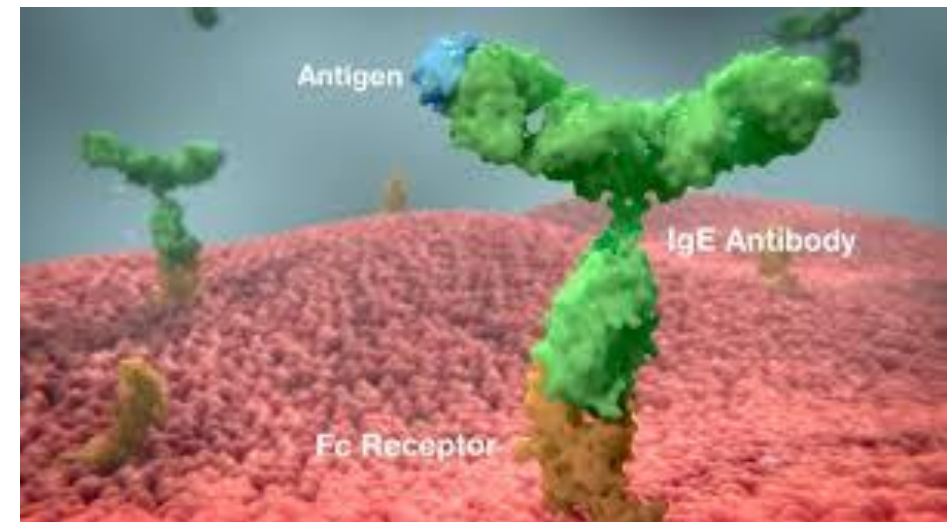
(ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOLOGY, March 2008; Volume 100, Number 3, Supplement 3)

Class	Lower Limit	Upper Limit	
0	0	0.35	Absent/Undetectable
1	0.35	0.7	Low Level
2	0.7	3.5	Moderate Level
3	3.5	17.5	High Level
4	17.5	50	Very High Level
5	50	100	Very High Level
6	100	1000	Very High Level

Szérum IgE tesztek tündöklése és bukása ?

- IgE felfedezői: „Az emelkedett szérum IgE megbízhatóbb mutatója az allergiás kórképeknek, mint a gyorsult süllýedés az infekciós, vagy malignus betegségeknek.”
- tapasztalat: szérum össz. IgE diagnosztikus értéke korlátozott: atopiás betegek 50%-ában a normál tartományba esik.

Temesvári E., Kárpáti S. Gyakorlati allergológia, 2009

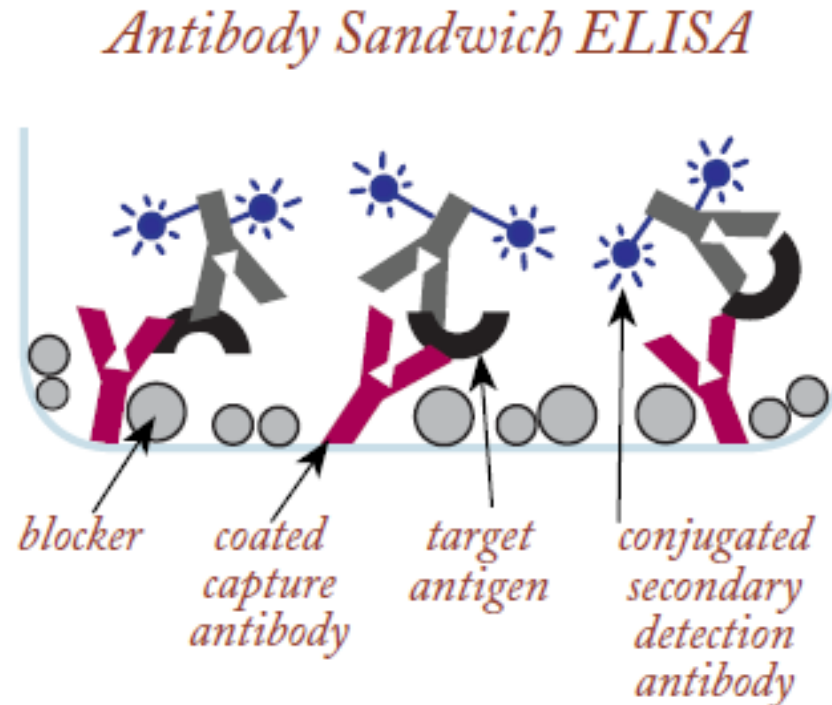


Szérum össz. IgE mérése

- Eredmény megadása nemzetközi egység, vagy nanogramm/ml:
 - 1 IU/ml= 2,44 ng/ml
- **Standardizált : WHO 75/502 human referencia szérum IgE !**
- Diagnosztikus érték korlátozott
 - Fontos: magas allergiás bronchopulmonaris Aspergillosis (ABPA) esetén
 - Mérése követelmény omalizumab terápia előtt a kezdő dózis megállapításához
- Leggyakoribb módszer: sandwich ELISA

Sandwich ELISA

- Anti-IgE antitest van szilárd hordozóhoz kötve
- Megköti a vizsgált szérum összes IgE molekuláját
- Minden más szérum protein kimosásra kerül
- A megkötött IgE második, jelölt anti-IgE antitest segítségével mérődik



Allergén specifikus IgE tesztek – megoldás?

- „Legfontosabb trigger molekula az allergiás gyulladásban.”
McPherson, Pincus 2011.
- Számos in vitro teszt került kidolgozásra és forgalomba



1980-as évek: szárnyalás időszak
több, mint 15 variáció:

- allergén forrás
- szilárd fázis
- detekáló antitest

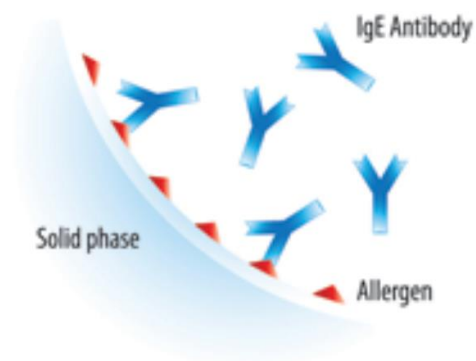
Legjelentősebb módszerek - máig

Method	Detected by	Technique
Phadebas RAST	Radioimmunoassay	Manual
Hitachi CLA (MAST)	Chemiluminescence	Semiautomatic
CAP System	Enzyme/substrate	Semiautomatic
Hycor Turbo-MP	Radioimmunoassay	Semiautomatic
Ala Stat	Enzyme/substrate	Semiautomatic
Hy-Tec E/A	Enzyme/substrate	Automatic
ImmunoCAP Systems	Enzyme/substrate	Automatic
Immulite 2000	Chemiluminescence	Automatic

Abbreviations: MAST, multiple allergen solvent test; RAST, radioallergen sorbent assay.



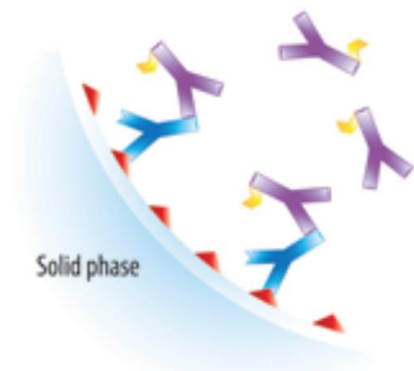
Leggyakoribb in vitro tesztek módszerei I.



Aranystandard:

ImmunoCap (1992): cellulóz alapú szilárd fázis:
extrém nagy kötési kapacitás

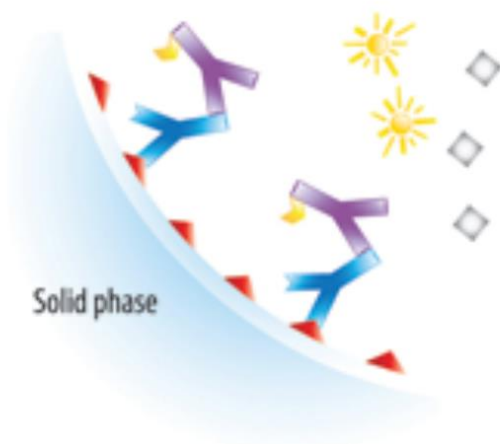
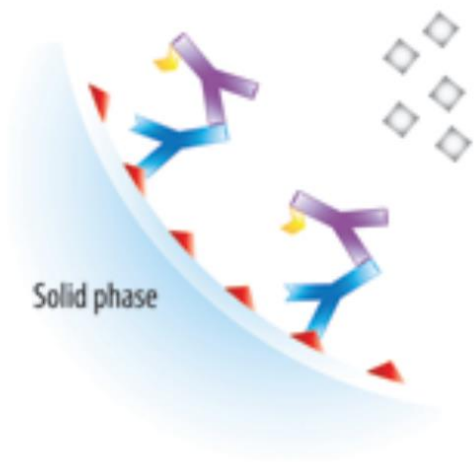
Allergének nagy mennyiségben, irreverzibilisen, natív szerkezetüket megőrizve kötődnek



Kikötött allergénekkal reagál a beteg szérumában lévő IgE

Az adott allergénre nem specifikus IgE kimosása után

Enzimmel jelölt anti-IgE-t adunk, komplex



Detektálás: enzim-szubsztrát reakción alapul

- Inkubáció letelte után a felesleges enzimmel jelölt anti-IgE-t kimossuk
- Szubsztráttal inkubáljuk

- Reakció leállítása után a **fluoreszcens jelet mérjük**

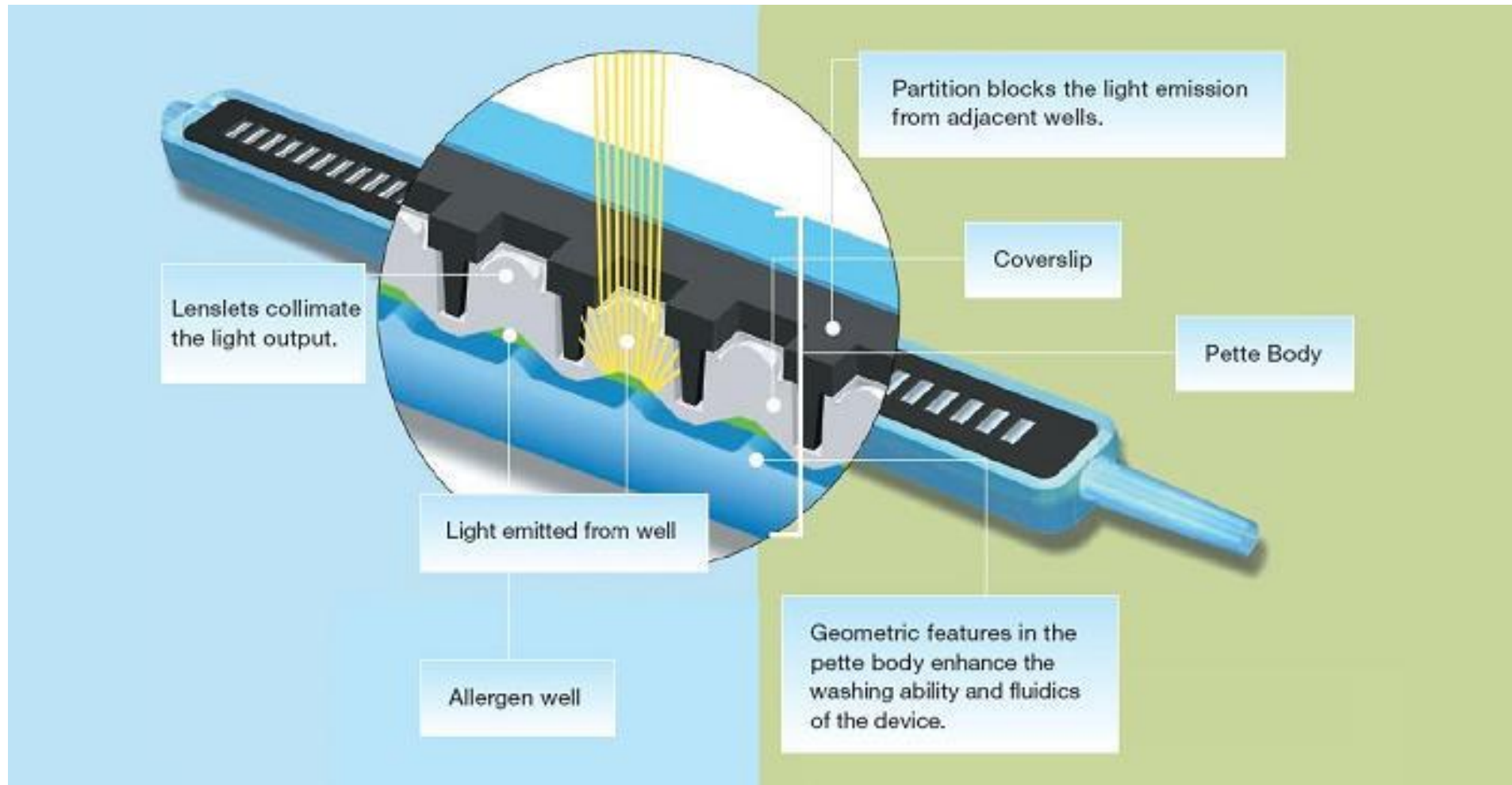
- Minnél nagyobb a fluerszcencia, annál több az allergén specifikus IgE a mintában

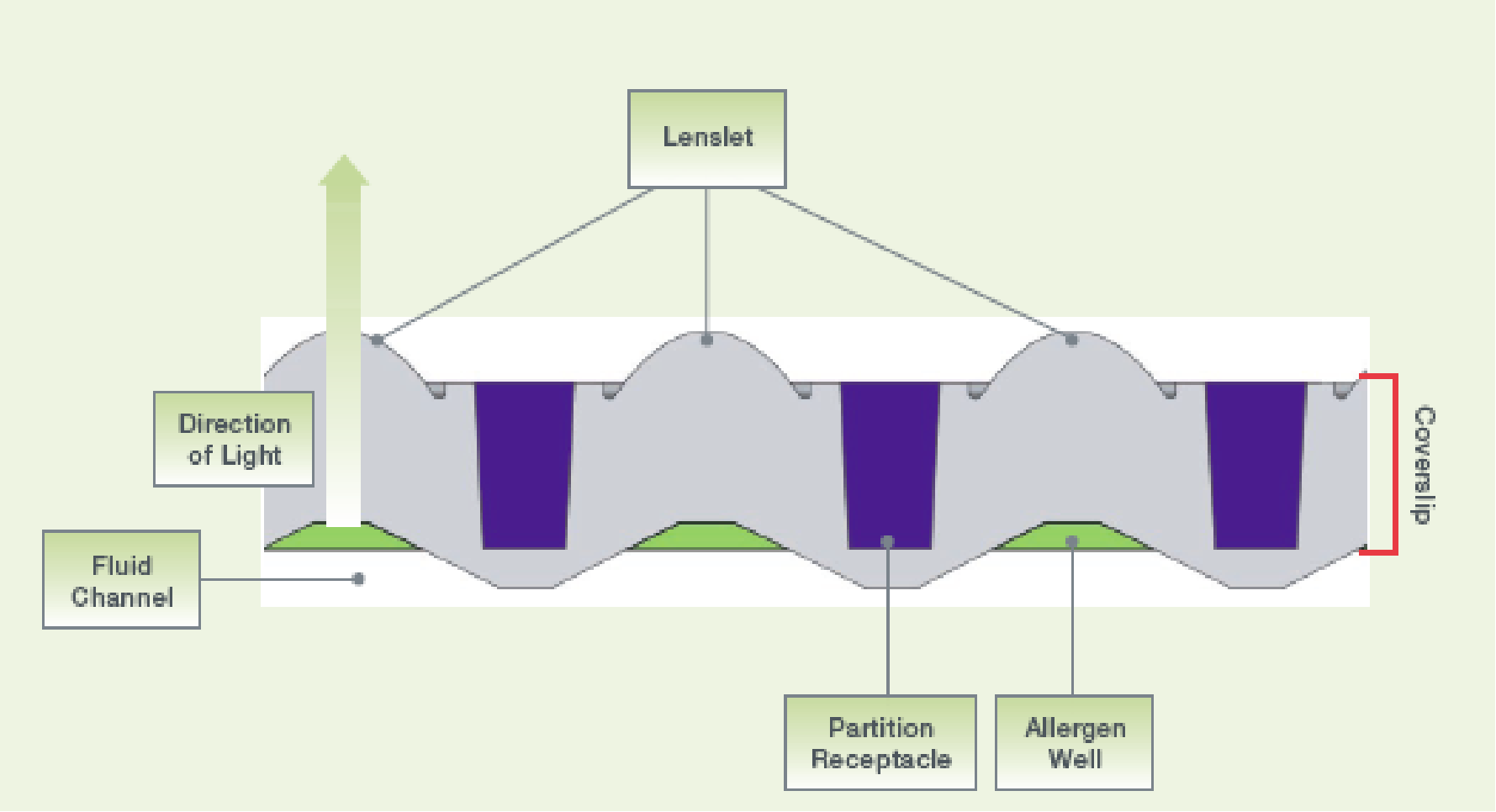
- Hytec 288 automata
- Detektálás eltér: fotometria
- 405 nm, átfolyó kűvetta



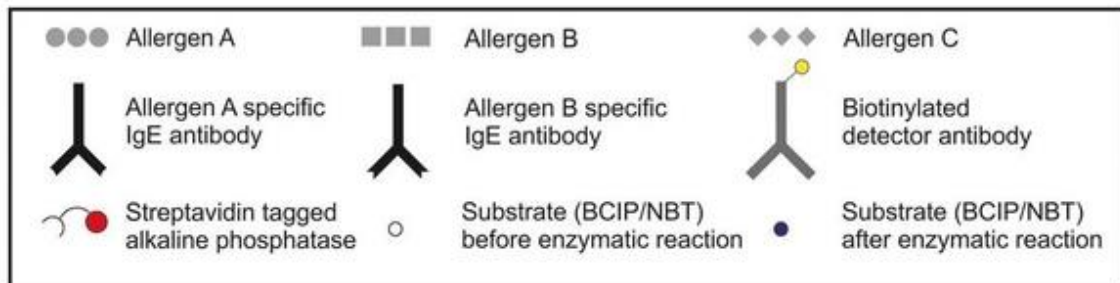
Leggyakoribb in vitro tesztek módszerei II.

Kemilumineszcencia: pl. Hitachi (CLA, Optigen)

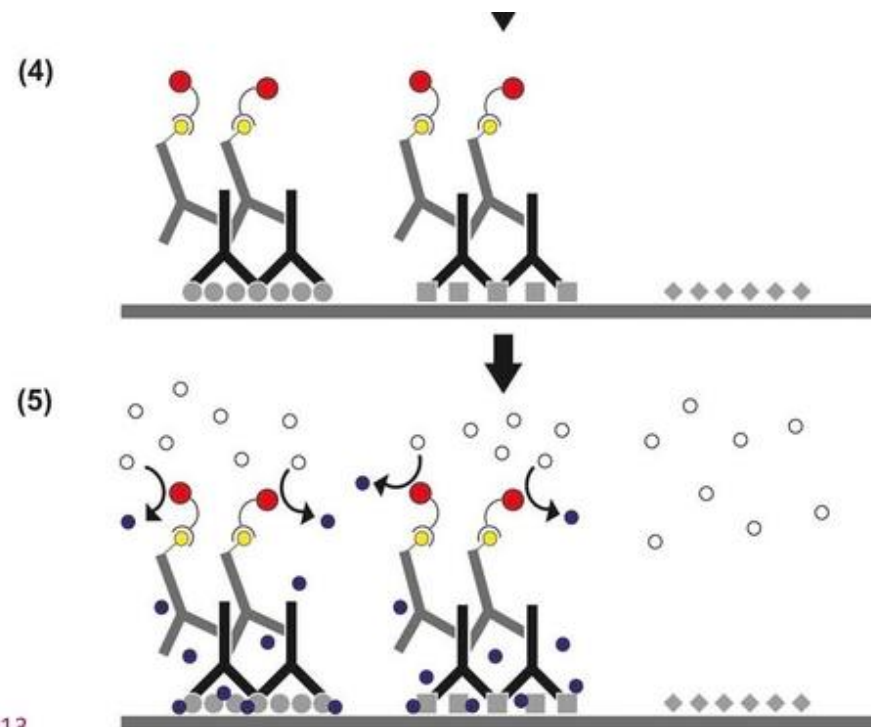
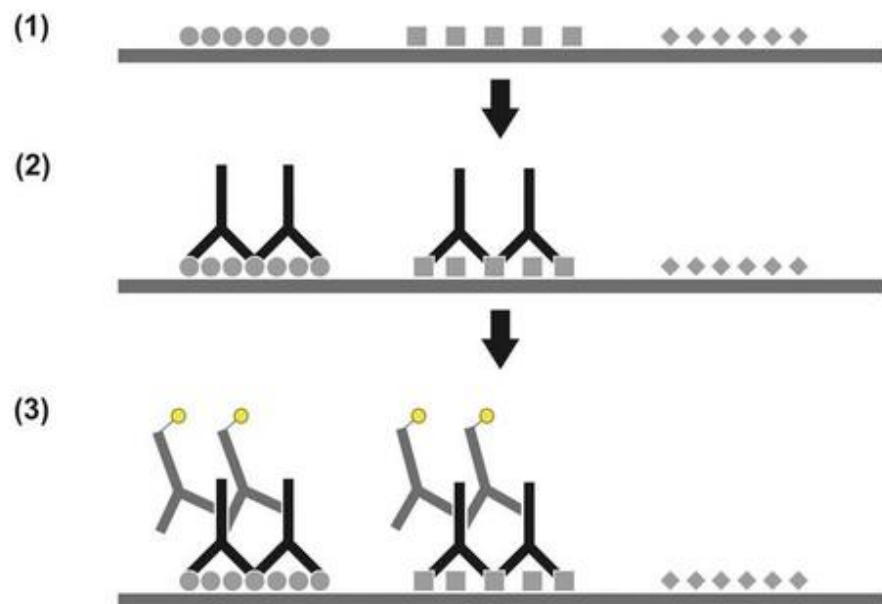


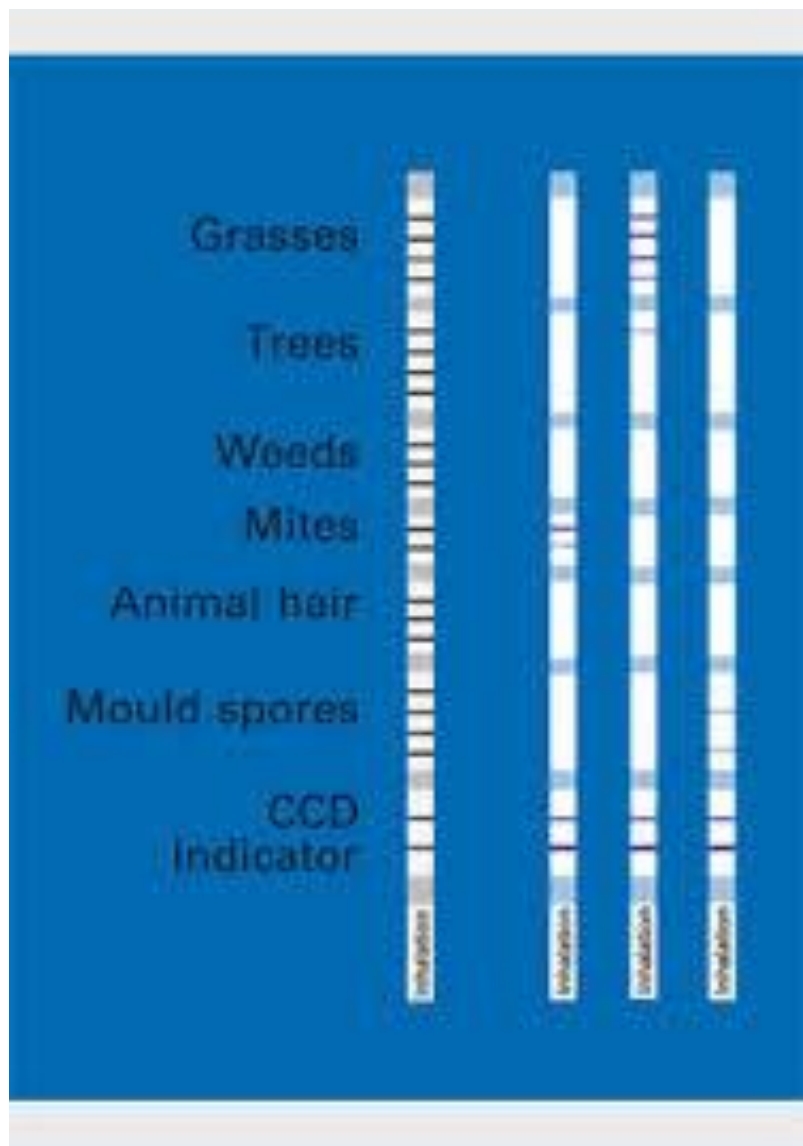


Leggyakoribb in vitro tesztek módszerei III.



Immunoblot: Mediwiss, Euroimmun





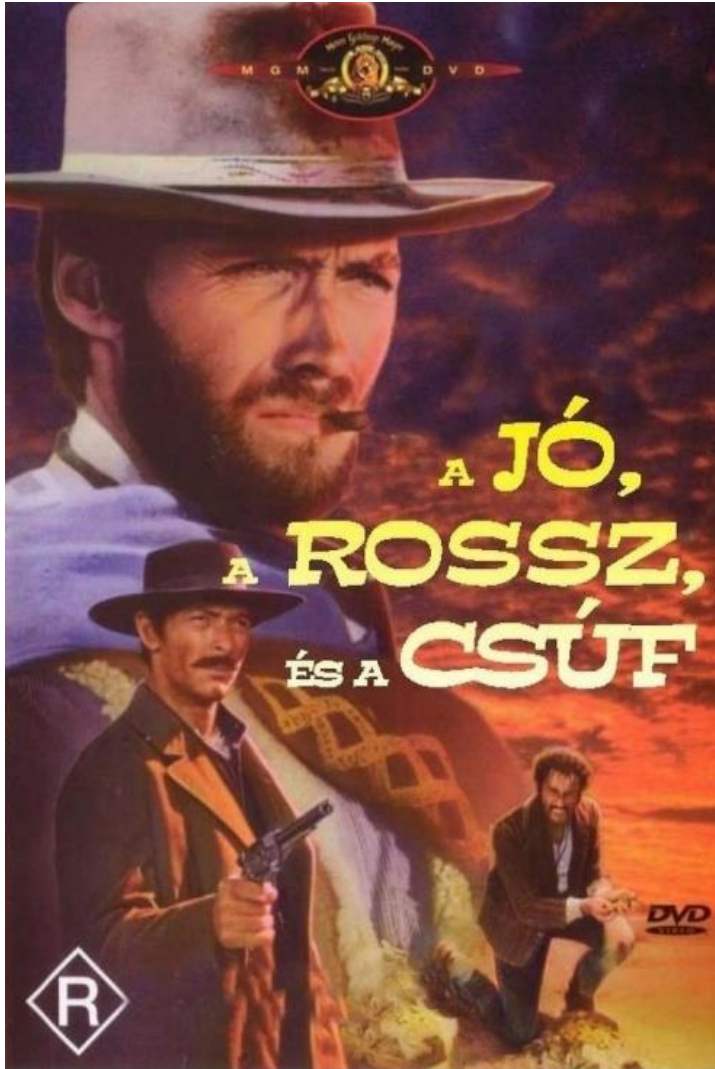
Benefit from excellent results at greatly reduced costs

Vissza a múltba ...

Az expanzió időszaká után:

- **USA: szkepticizmus kora**
 - Különböző tesztek eltérő eredményei (különböző módszerek)
 - Klinikai standaroktól való eltérések (standardizálás kérdéses)
 - Gyengébb szenzitivitás, mint bőrteszt
 - Kis vizsgálati paletta
- **Allergológusok bojkottálták egy időben a vizsgálatokat**
- **Magyarország** specifikus IgE és IgG vizsgálati szám finanszírozás sajátosságai miatt rendkívül magas:
Prof. Dr. Sipka Sándor 2015. QualiCont Fórum: 1999. allergén spec IgE és IgG: 25%, zárt laborkassza egyik indoka!

Standardizálás, minősegbiztosítás



- A labordiagnosztika nélkülözhetetlen velejárója
- Szérum össz IgE: standarizált :
WHO 75/502 human referencia szérum IgE
- Allergén pecifikus IgE:
Valami van, de nem az igazi még!

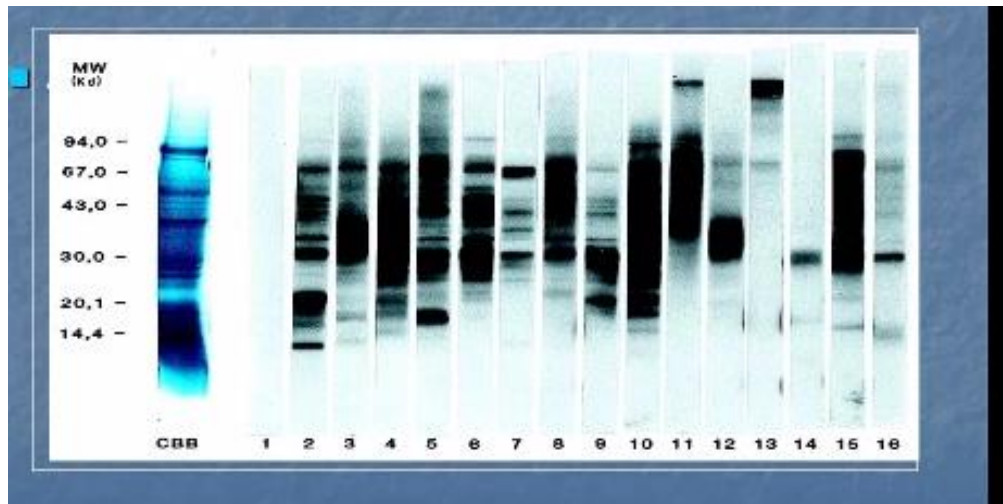
Mérföldkő: 1992. ImmunoCap:

- kötő kapacitás emelkedése
- tisztított és karakterizált allergének
- total IgE méréshez kalibrált (1Ua/ml= 2,42 ng/ml)
- automatizált

Ma tudjuk-e, hogy mit mérünk?

- Allergén: funkcionálisan jellemzett antigének, melyek IgE képződést indukálnak
- Inhalatív és nutritív **allergén extraktumokat** használnak a hagyományos tesztek
- Allergén kivonatok: nagyszámú antigén molekulát tartalmazhatnak
 - Major allergének: a betegek többségében (50%) IgE választ eredményez
 - Minor allergén: a betegek kisebb hányadában okoz szeinizitizációt

Temesvári E., Kárpáti S. Gyakorlati allergológia, 2009



P. Brock Williams, Children's Mery Hospital (ACAAI) 2013

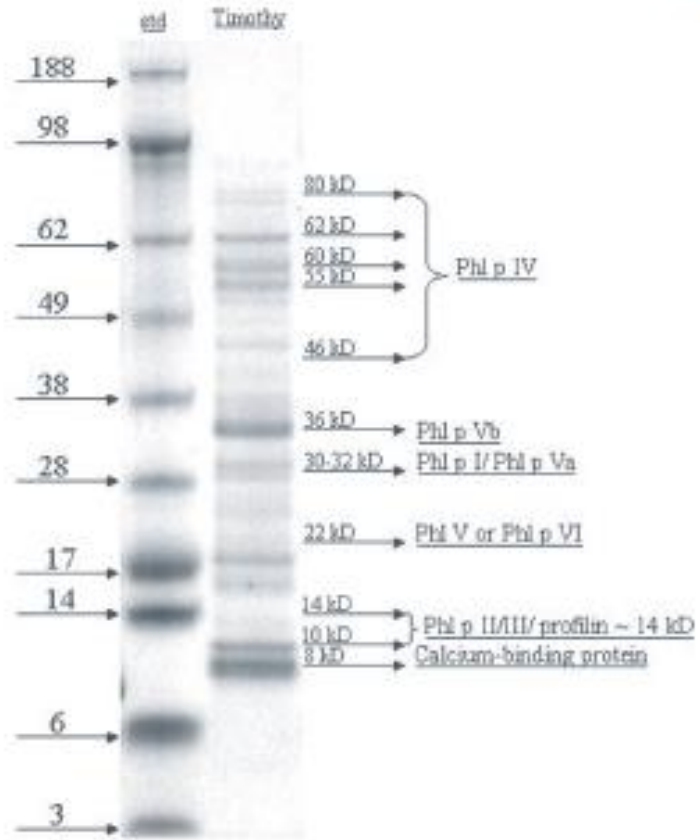


Fig. 6 | SDS-PAGE for Timothy Grass with Major Allergenic Proteins Identified

- A jó minőségű tesztek gyártói saját standardizálást alkalmaznak
- Allergén fehérjék biztosan és aktívan a tesztben legyenek
- Folyamatos minőség-ellenőrzés
- **Egységes nemzetközi standard nincs**

- Különböző protein antigéneknek hasonló aminosav szekvenciája lehet, melyek az allergének között keresztreaktivitást eredményezhet.
- Klinikai szenzitivitás és specificitás változó
 - Érzékenység prick teszthez viszonyítva: kevesebb, mint **50 – 90 %**
- Allergén specifikus IgE teszt preferálandó bőrteszttel szemben:
 - Kiterjedt bőrbetegség
 - Terápia, ami befolyásolja a bőrtesztet
 - Nem kooperáló beteg
 - Magas rizikó anafilaxiás reakcióra
 - Terhesek, kisgyermek

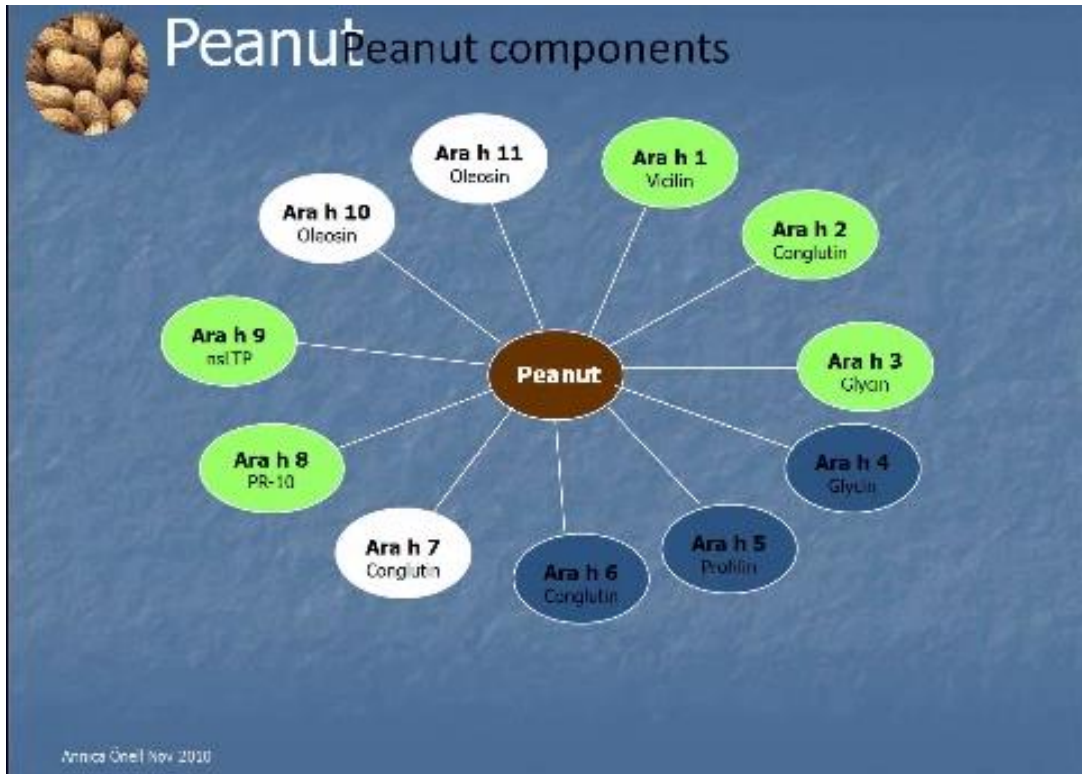
- Interpretációnál figyelembe kell venni:
 - Allergén kötőképessége, aviditása
 - Szilárd fázis minőségét
 - Keresztreakciók lehetőségét
 - Magas IgE szintet (20 000 IU/ml felett)
 - Magas specifikus IgG szintet



- Az allergéintás, potencia és stabilitás eltérő a forgalomban lévő allergén extraktumok között
- Úgy tűnik, hogy a pozitív prediktív érték magasabb a polleneknél, stabil, anafilaxiára hajlamosító ételeknél, atkánál, némely epithel allergénnél és gombánál, mint rovarméregnél, gyógyszernél és egyéb kemikália esetén

Allergén specifikus IgE tesztek bukása?

NEM – tisztában kell lenni a diagnosztikus értékkel



Tovább lépés/kiegészítés:
Komponens alapú diagnosztika
Diagnosztikus értéket ismerni
kell!

Összefoglalás

- Az allergiás megbetegedések előfordulása nő
- Az egyik legfontosabb molekula az IgE
- A labor vizsgálatok jelentősége, hogy az allergiás betegség valószínűségét alátámasztják – segítség diagnózis felállításában
- A szenzitizáció megállapítása után az allergén kerülésével csökkenthetőek a tünetek és a szövődmények
- Bizonyos terápia megkezdése előtt az IgE mérése követelmény

Köszönöm a figyelmet!