



Felines allergenspezifisches IgE

Leistungsmerkmale eines polyklonalen Antikörper-ELISA-Tests zum Nachweis von IgE bei Katzen und Vergleich mit einem IgE-Rezeptor-basierten ELISA

Es ist davon auszugehen, dass die atopische Dermatitis bei Hunden und Katzen eine ähnliche Pathophysiologie aufweist. Wie beim Hund unterstützt der Nachweis von allergen-spezifischem IgE bei Katzen die Identifizierung der wahrscheinlich verantwortlichen Allergene, nachdem eine Umweltallergie anhand von Krankengeschichte und klinischer Symptomatik sowie nach Ausschluss anderer Ursachen einer pruriginösen Dermatitis diagnostiziert wurde. Bei Hunden liefert die Bestimmung der IgE-reaktiven Allergene eine Leitlinie für die Vermeidung der verantwortlichen Allergene und/oder für die Immuntherapie¹.

Hintergrund

Ab Sommer 2012 bietet IDEXX Laboratories Allergietests an, bei denen ELISA-basierte Reagenzien von Greer Laboratories (Lenoir, NC, USA) verwendet werden. Bei den Greer-Reagenzien wird ein affinitätsgereinigtes polyklonales Antiserum zum spezifischen Nachweis von feline IgE verwendet. Der bislang von IDEXX Laboratories angebotene Assay zum Nachweis von feline IgE basierte auf der Fcε-Rezeptortechnik (rekombinantes humanes IgE-Epsilon-Rezeptorfragment).

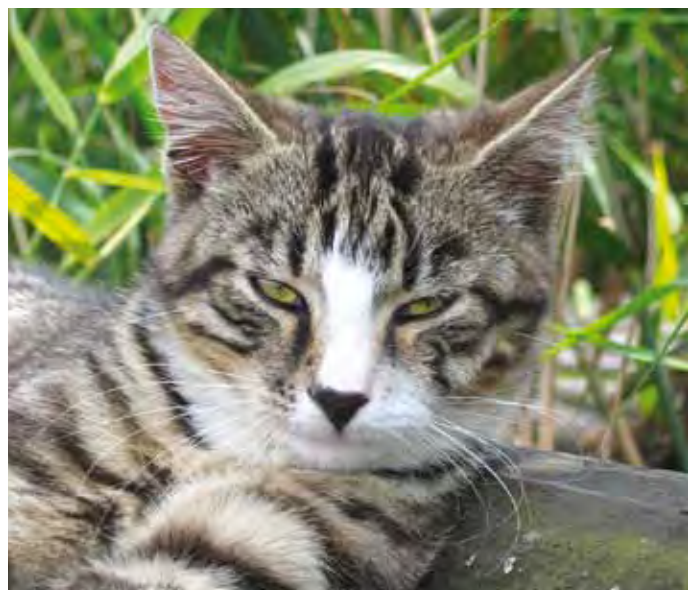
Eine bereits veröffentlichte Studie mit Hunden hat deutlich die Gleichwertigkeit des Greer-Testsystems mit einem Testverfahren, bei dem das humane Fc-Rezeptorfragment verwendet wird, nachgewiesen². Für die Proben von Hunden verwendet das Greer-System eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern, die gegen die Fc-Region des caninen IgE gerichtet sind. Für Proben von Katzen hingegen verwendet das Greer-System ein gegen die Fc-Region des feline IgE gerichtetes polyklonales Antiserum.

Diese Arbeit fasst die vergleichenden Daten der beiden Methoden zum Nachweis von IgE zusammen. Obwohl die beiden Methoden unterschiedliche Technologien verwenden, wird eine gleichwertige Leistung festgestellt. Die genannten Daten sprechen eventuell für eine höhere Sensitivität des Greer-Assay für die Bestimmung des allergenspezifischen IgE.

Methoden und Ergebnisse

Zur Beurteilung des Nachweises von spezifischem IgE bei Katzen wurden zwei Experimente durchgeführt

- Vergleich der Anti-IgE-Nachweismoleküle unter Verwendung gepoolter Seren von Katzen
- Vergleich der kompletten Assays unter Verwendung von Anti-IgE oder Fc-Rezeptor bei Einzelproben von Katzenserum.



¹ Olivry et al (2010) Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis, *Veterinary Dermatology*, 21: 233 – 248.

² Lee et al (2009) Performance characteristics of a monoclonal antibody cocktail-based ELISA for detection of allergen-specific IgE in dogs and comparison with a high affinity IgE receptor-based ELISA, *ACVD* 20: 157 – 164.

A. Vergleich der Anti-IgE-Nachweismoleküle

1. Material und Methoden

Aus zahlreichen Einzelproben, die zuvor mithilfe von Greer-Reagenzien gescreent worden waren, wurden vier separate Serumpools hergestellt. Ein Serumpool war hoch reaktiv gegenüber Pollen, ein anderer hoch reaktiv gegen Milben und ein weiterer reaktiv gegenüber Schimmelpilzen. Der vierte Serumpool wurde aus Proben hergestellt, die nachweislich nicht oder nur gering reaktiv gegenüber den meisten Allergenen waren, und wurde daher als negativer Pool bezeichnet. Die positiven Pools wurden mit dem negativen Pool seriell verdünnt.

Alle Proben wurden sowohl mit dem polyklonalen Nachweissystem von Greer als auch mit dem rekombinanten humanen Fc-Rezeptor-Nachweissystem untersucht. Um jede Variabilität aufgrund unterschiedlicher Herkunft der Allergene auszuschalten, erfolgte die Untersuchung aller Proben mit von der Firma Greer hergestellten allergenbeschichteten Platten, die das gesamte regionale Allergenspektrum des Nordostens von Nordamerika umfassten. Alle Ergebnisse wurden in ELISA-Millieinheiten (ELISA milli absorbance units/EAU) mit Hintergrundkorrektur angegeben. Reaktionen mit > 150 EAU wurden als positiv für das spezifische Allergen angesehen.

2. Ergebnisse und Diskussion

Der negative Serumpool zeigte unabhängig von der verwendeten Nachweismethode keine oder nur minimale Reaktion (≤ 300 EAU) gegenüber den Allergenen des regionalen Allergen-Panels des Nordostens Amerikas (Daten sind nicht aufgeführt).

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen repräsentative Daten, die nach Verdünnung des auf Pollen hoch reaktiven Pools erhalten wurden. In Abbildung 3 und 4 sind die Reaktionen der Verdünnungsreihe jener Pools, die hoch reaktiv gegenüber Milben bzw. gegenüber Schimmelpilzen waren, dargestellt.

Die repräsentativen Dosis-Wirkungskurven für Gräserpollen-Allergene zeigen, dass dieser Serumpool hoch reaktiv auf Gräser reagierte, und dass sich bei beiden IgE-Nachweismethoden die Reaktion direkt proportional zu den Verdünnungsfaktoren reduzierte. Gleiches zeigte sich sowohl bei den Kräutern (nicht dargestellt) als auch bei den Milben. Die generelle parallele Signalreduktion, die bei den meisten Pools – insbesondere bei den Bäumen und Gräsern – zu beobachten war, ist ein Hinweis darauf, dass diese Nachweissysteme ähnliche, wenn nicht dieselben Moleküle messen. Wie es scheint, ist die Intensität der Reaktionen bei Proben mit einem geringeren Gehalt an spezifischem IgE beim Anti-IgE-basierten ELISA durchgehend höher. Am deutlichsten trat dies bei den Milben- und Schimmelpilzallergenen zutage.

Die Intensität der Reaktionen bei unverdünnten Seren, die bei den meisten Schimmelpilzen sowie bei *D. pteronyssinus* zu sehen war, ist beim Anti-IgE-Nachweis wesentlich stärker. Zudem scheint die Signalreduktion nicht parallel mit der Verdünnung zu verlaufen. Die genauen Ursachen für solche

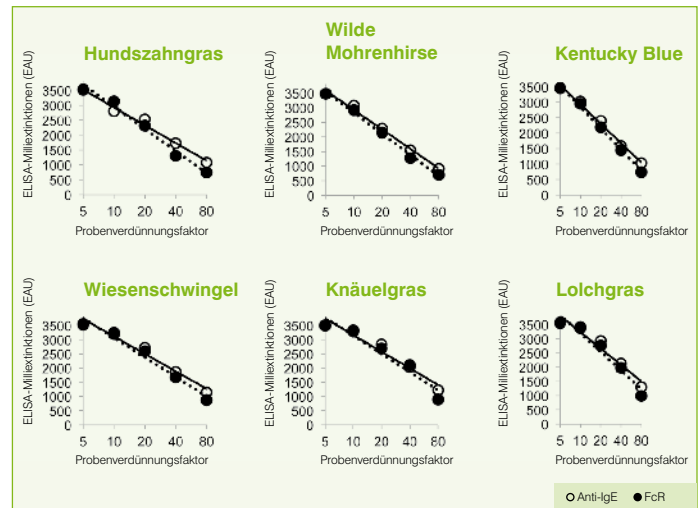


Abbildung 1: Vergleich des Ansprechens bei verdünnten Proben zwischen einem rekombinanten und einem polyklonalen IgE-Nachweissystem unter Verwendung eines felinen Serumpools mit hoher Reaktivität gegenüber Pollen. Dargestellt sind repräsentative Reaktionen auf Gräser. Die Grafik zeigt, dass die Ansprechkurven für beide Methoden parallel verlaufen.

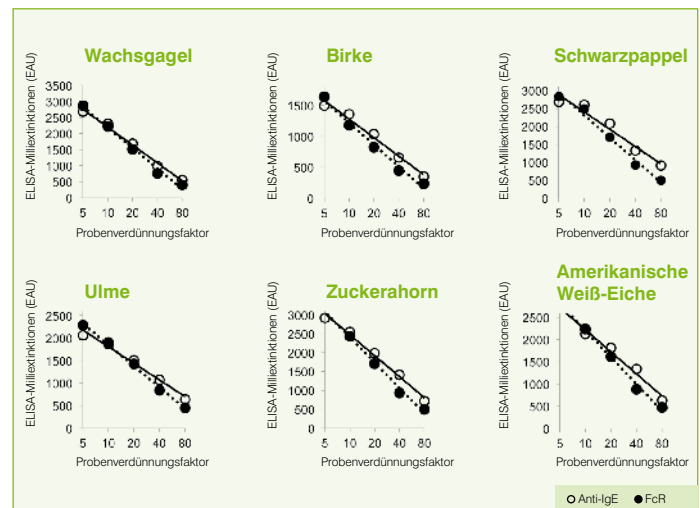
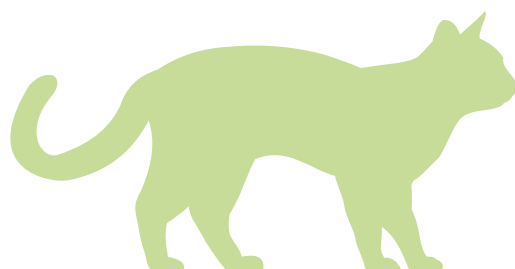


Abbildung 2: Vergleich des Ansprechens bei verdünnten Proben zwischen einem rekombinanten und einem polyklonalen IgE-Nachweissystem unter Verwendung eines felinen Serumpools mit hoher Reaktivität gegenüber Pollen. Dargestellt sind repräsentative Reaktionen auf Bäume. Die Grafik zeigt, dass die Ansprechkurven für beide Methoden parallel verlaufen.



Unterschiede in der Intensität und im verdünnungsabhängigen Ansprechen bei manchen Umweltallergenen sind nach wie vor unbekannt. Es ist jedoch möglich, dass es nach Exposition gegenüber diesen Allergenen zur Ausbildung unterschiedlicher „Subklassen“ von IgE-Antikörpern kommt. Im Falle von Milben und Pilzen weist das induzierte IgE unter Umständen eine Konformationsänderung am Fc-Rezeptor-Epitop auf und kann in der Folge nicht vom Fc-Rezeptor-Reagens gefunden werden. Die Detektion mehrerer potenzieller IgE-spezifischer Epitope durch Anti-IgE würde zu deutlich stärkeren Reaktionen führen.

B. Anti-IgE- und Fc-Rezeptor-basierte Assays im Vergleich

1. Material und Methoden

Zehn Einzelproben von Katzenserum wurden sowohl mit dem kompletten Greer-Testsystem als auch mit dem bislang von IDEXX Laboratories angebotenen kompletten Testsystem auf der Basis des rekombinanten humanen Fc-Rezeptors getestet. Bei allen Tests wurde ein europäisches Allergen-Panel verwendet. Alle Proben wurden nach Angaben der Hersteller mit den kompletten Testkits analysiert. Der Vergleich der beiden Methoden erfolgte anhand von Allergenen, die in beiden Panels vertreten waren. Diese Allergene sind in Anhang 1 aufgelistet. Ergebnisse > 150 EAU wurden bei beiden Assays als positiv angesehen.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die zusammengefassten Ergebnisse der Blindstudie zum Vergleich des felinen allergenspezifischen IgE-Assays von Greer mit dem IgE-Test auf der Basis von rekombinanten Fc-Rezeptor sind in Tabelle 1 dargestellt. Insgesamt wurden zehn Proben hinsichtlich eines vergleichbaren Allergen-Panels von 26 Allergenen analysiert, was eine Gesamtzahl von 260 Beobachtungen ergibt. Die Übereinstimmung für alle Allergene lag bei 81,5 % und war in allen Allergen-kategorien vergleichbar. Die Konkordanz betrug bei Gräsern 83,3 %, bei Milben 85 %, bei Pilzen 100 % und bei Kräutern 80 %. Bei den Baumallergenen wurde mit 72,2 % die geringste Konkordanz beobachtet.

Allerdings war in der Kategorie der Bäume die Konkordanz nicht durchgängig niedrig, sondern nur bei vereinzelt Allergenen (z. B. Eiche). Dies mag jedoch eher auf Unterschiede bei den Allergenen, mit denen die Platte beschichtet wurde, als auf Unterschiede im IgE-Nachweismechanismus hinweisen.

Für die Gesamtheit der Ergebnisse wurde eine Übereinstimmung von etwa 82 % berechnet, während die Konkordanz bei den Einzelproben zwischen 65,4 % und 96,2 % lag (Daten nicht aufgeführt). Die größte Diskordanz war das Ergebnis von Varianzen um den Cutoff-Wert.

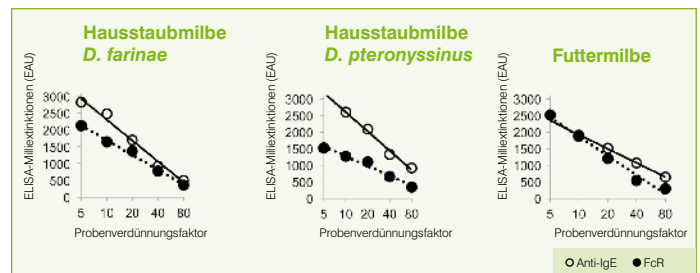


Abbildung 3: Vergleich des Ansprechens bei verdünnten Proben zwischen einem rekombinanten und einem polyklonalen IgE-Nachweissystem unter Verwendung eines felinen Serumpools mit hoher Reaktivität gegenüber Milben. Die Reaktionen sind dargestellt. Die Diagramme zeigen, dass bei den beiden Testmethoden das Ansprechen nicht so konsistent parallel verläuft wie bei den Pollenallergenen.

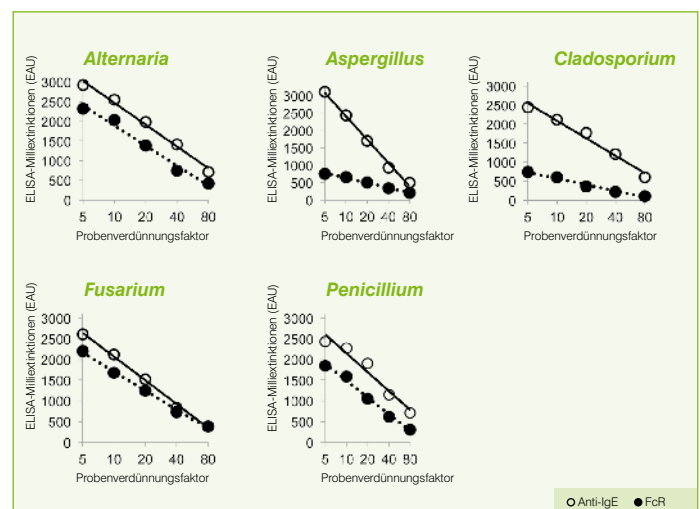


Abbildung 4: Vergleich des Ansprechens bei verdünnten Proben zwischen einem rekombinanten und einem polyklonalen IgE-Nachweissystem unter Verwendung eines felinen Serumpools mit hoher Reaktivität gegenüber Schimmelpilzen. Die Reaktionen sind dargestellt. Die Daten zeigen eine Variabilität der parallelen Ansprechkurven zwischen den beiden Methoden.

Zusammenfassung

Diese Studie belegt die vergleichbare Eignung des Anti-IgE-basierten ELISA von Greer und des rekombinanten humanen Fc-Rezeptor-basierten ELISA zur Messung von allergenspezifischem IgE bei Katzen. Die bei beiden Assays beobachteten parallelen Dosis-Ansprechkurven für den Großteil von allergenspezifischem IgE bei Katzen zeigen, dass die beiden Tests IgE auf ähnliche Art und Weise messen. Die Single-Epitop-Spezifität des Fc-Rezeptors kann die Menge der Tracer-Moleküle, die innerhalb des IgE-Moleküls binden können, begrenzen. Die Multiple-Epitop-Spezifität des polyklonalen Anti-IgE-Reagens sollte erweiterte Nachweisgrenzen und eine Steigerung der Signalgröße ermöglichen. Dies wurde in der vorliegenden Studie bei Proben, die nur geringe Konzentrationen an allergenspezifischem IgE aufwiesen, deutlich. Neben den Unterschieden in den Tracer-Reagenzien kann die Diskordanz der Ergebnisse auch auf Unterschiede bei den Allergenextrakten zurückzuführen sein, die für die Beschichtung der Vertiefungen der Mikrotiterplatte verwendet wurden.

Tabelle 1: Konkordanz der Ergebnisse zwischen Testkits mit Anti-IgE bzw. Fc-Rezeptor zur Analyse von feline Einzelproben (n=10)

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	ALLE Allergene			
	Negativ	132 50,8 %	19 7,3 %	151
	Positiv	29 11,2 %	80 30,8 %	109
	Gesamt	161	99	260

Konkordanz alle Allergene = 81,5 %

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	Gräser			
	Negativ	14 46,7 %	0 0 %	14
	Positiv	5 16,7 %	11 36,7 %	16
	Gesamt	19	11	30

Konkordanz Gräser = 83,3 %

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	Kräuter			
	Negativ	31 51,7 %	2 3,3 %	33
	Positiv	10 16,7 %	17 28,3 %	27
	Gesamt	41	19	60

Konkordanz Kräuter = 80 %

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	Bäume			
	Negativ	44 48,9 %	14 15,6 %	58
	Positiv	11 12,2 %	21 23,3 %	32
	Gesamt	55	35	90

Konkordanz Bäume = 72,2 %

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	Milben			
	Negativ	4 10 %	3 7,5 %	7
	Positiv	3 7,5 %	30 75 %	33
	Gesamt	7	33	40

Konkordanz Milben = 85 %

		Fc-Rezeptor		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Anti-IgE	Pilze			
	Negativ	39 97,5 %	0 0 %	39
	Positiv	0 0 %	1 2,5 %	1
	Gesamt	39	1	40

Konkordanz Pilze = 100 %

Anhang 1: Auflistung der mit beiden Assays getesteten europäischen Allergen-Panels

KRÄUTER	GRÄSER	PILZE	BÄUME	MILBEN
Beifuß Brennnessel Spitzwegerich Weißer Gänsefuß Beifußblättrige Ambrosie Kleiner Sauerampfer	Wiesenschwingel Lieschgras Lolchgras	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i>	Birke Erle Eiche Haselstrauch Weide Pappel Olive/Esche Ahorn Ulme	Vorratsmilben (<i>Acarus</i>) Hausstaubmilbe (<i>D. farinae</i>) Hausstaubmilbe (<i>D. pteronyssinus</i>) Futtermilbe (<i>T. putrescentiae</i>)

