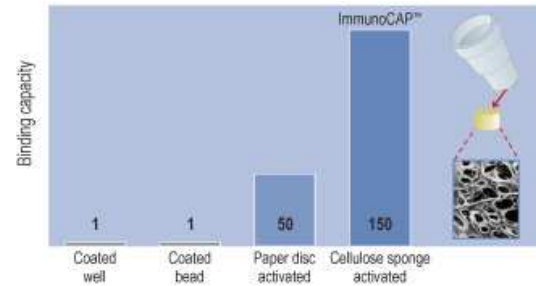


# Multiplexové metody v diagnostice alergen-specifických IgE

Lochman I.  
oddělení imunologie a alergologie  
ZÚ Ostrava

# Definice

- „jednoanalytové“ metody umožňují stanovit jeden analyt v jedné reakční nádobce nebo na jedné reakční ploše
- multiplexové metody umožňují stanovit několik až několik desítek analytů v jedné reakční nádobce nebo na jedné reakční ploše
- mikroarraye (mikročipy) umožňují stanovit stovky až tisíce analytů v jedné reakční nádobce nebo na jedné reakční ploše



ImmunoCAP 100



## Alergeny panelu ImmunoCAP Rapid

e1 kočka	e5 psí srst
t3 bříza pyl	t9 oliva pyl
w6 pelyněk	w21 drnavec
g6 bojínek	d1 Derm.pteron.
f1 vaječný bílek	f2 kravské mléko

**ImmunoCAP® ISAC**  
Immuno Solid-phase Allergen Chip



zatím 103 alergenních komponent ze 47 zdrojů alergenů kryje většinu důležitých alergen-specifických i zkříženě reagujících alergenních komponent

## Proč multiplexové metody v diagnostice alergen-specifických IgE?

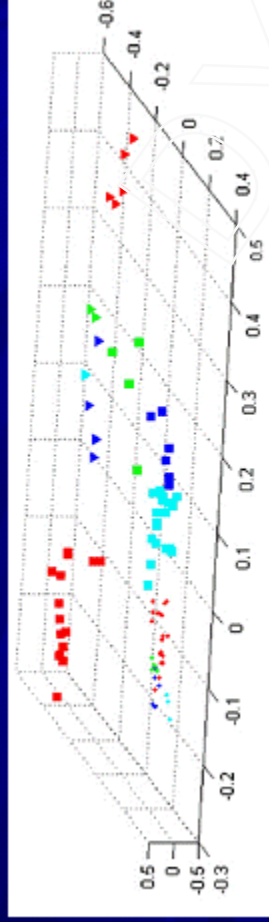
- jsou méně pracné a levnější, potřebujeme-li stanovit ve vzorku více než 3 analyty
- mají menší spotřebu analyzovaného vzorku
- ukazuje se, že alergeny lze seskupovat do skupin, pro které lze nalézt typické zástupce, na které je reaktivní většina osob postižených alergií na alergeny příslušné skupiny

- Fungi
- Weed pollen
- Mites
- Tree and weed pollen
- Tree and apple
- Epithelium/dander
- Animal food
- Fish
- Seafood and insect
- Grass pollen
- Plant food general
- Nuts and legumes

Trojdimenzionální mapa ukazující vztah 89 alergenů podle CMDS na logaritmu koncentrací spíše u 1011 vzorků multireaktivních jedinců.

Vytvořeno bylo 12 klastřů.

CMDS = classical multidimensional scaling

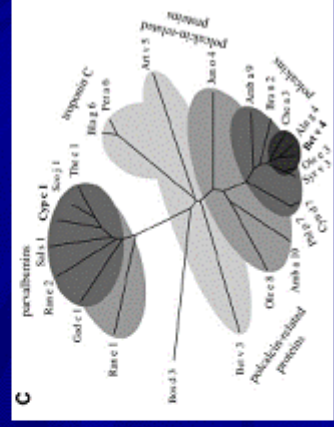
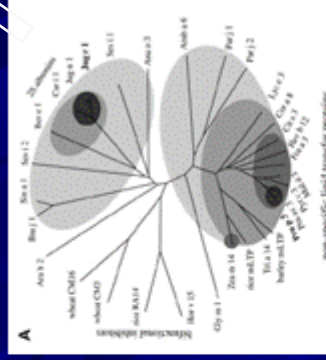
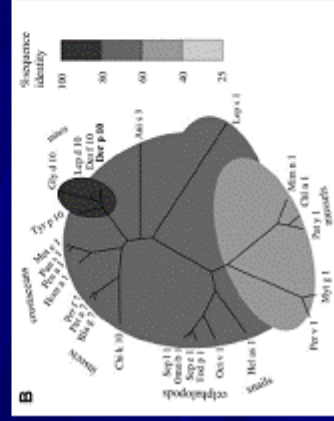


J Allergy Clin Immunol 2007; 120: 1333-1440

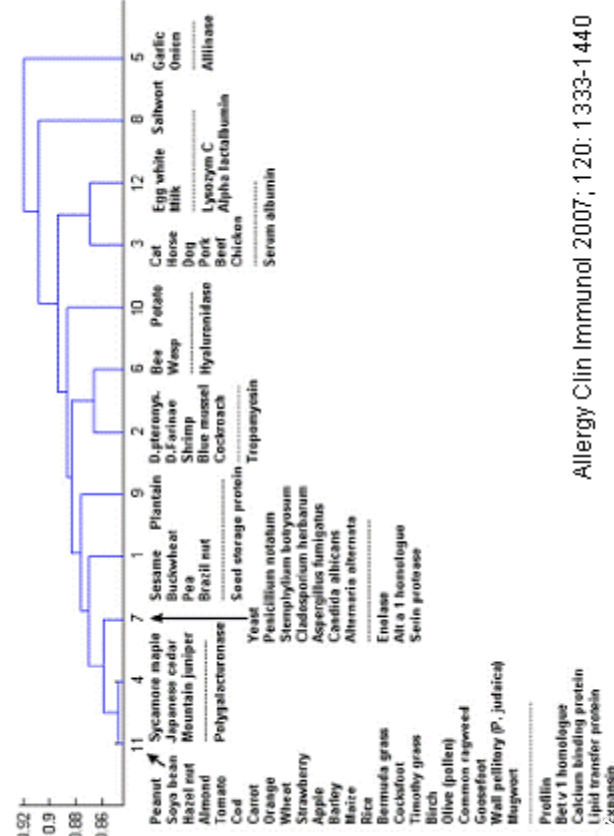
## Sekvenční podobnost mezi homologními alergeny

- A – superrodina prolaminu
- B – rodina tropomyosinu
- C – superrodina „EF-hand“

podle J Allergy Clin Immunol 2008;121:847-52



## Typické alergeny pro každý klastř jsou uvedeny vztý pod čarou.



Allergy Clin Immunol 2007; 120: 1333-1440

## 15 proteinových rodin s největším počtem alergenů klasifikováno podle:

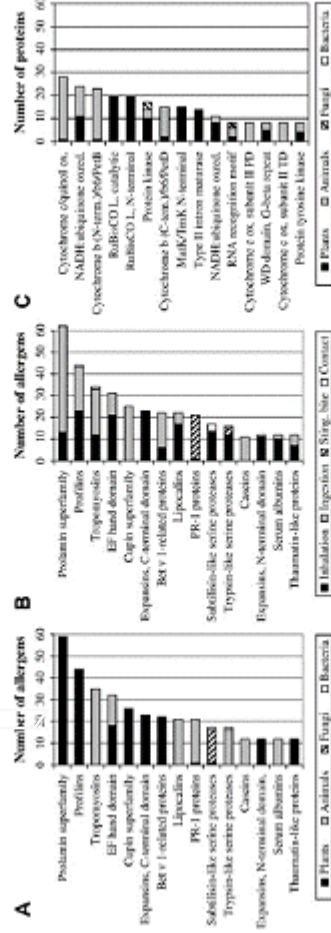


FIG 1. The 15 protein families with the highest number of allergens classified by source (A) and route of exposure (B). Numbers in Fig 1, B, differ because of multiple or missing routes of exposure for some allergens. C, Protein family distribution of randomly selected sequences. ox., Oxidase; oxd., oxidoreductase; PD, periplasmic domain; RuBi5Co, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase; TD, transmembrane domain; term., terminal; MADH, nicotinamide adenine dinucleotide.

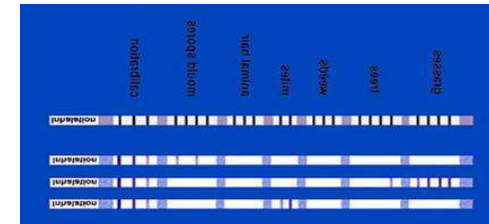
# Proč multiplexové metody v diagnostice alergen-specifických IgE?

- jsou méně pracné a levnější, potřebujeme-li stanovovat ve vzorku více než 3 analyty
- mají menší spotřebu analyzovaného vzorku
- ukazuje se, že alergeny lze seskupovat do skupin, pro které lze nalézat typické zástupce, na které je reaktivní většina osob postižených alergií na alergeny příslušné skupiny
- to vyvolává předpoklad, že racionální laboratorní diagnostika alergií pomocí stanovování koncentrací specifických IgE bude moci být v budoucnosti prováděna pomocí definovaných panelů alergenů, jejichž počet nebude vysoký.

# Line/dot multiplexové testy pro diagnostiku spec. IgE

**Ridascreen** r-Biopharm  
**Allergoscan** Innogenetics  
**PolyCheck** Biocheck  
**Optigen** Hitachi

**Euroline** Euroimmun



## ALBIA

 ImmuneTech

Alternaria, Bermuda Grass, Cat Dander, Egg White, Milk, Pternoyssinus,  
Mountain Cedar, Short Ragweed, Timothy Grass, Wheat  
jen servis, vyšetření ze zaslaného vzorku  
[www.immunetech.com](http://www.immunetech.com)

**INDOOR**  
biotechnologies 

5-plex: Der p 1, Der f 1, Mite Group 2, Fel d 1, Can f 1  
8-plex: Der p 1, Der f 1, Mite Group 2, Fel d 1, Can f 1, Rat n 1, Mus m 1, Bla g 2

[www.inbio.com](http://www.inbio.com)

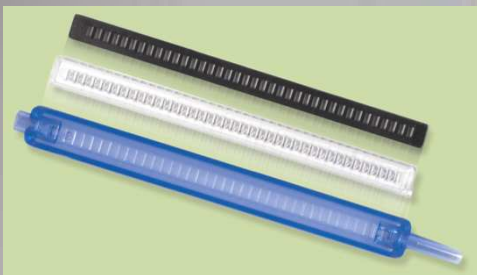
Luminex 100/200 System



## Line/dot imunoblotovací techniky pro stanovení sp.IgE

metoda	výrobce	panely	alergenů v panelu	cena za panel
Ridascreen	R-Biopharm	Inhalační a potravinové alergeny Inhalační alergeny Potravinové alergeny Pediatrický panel	20 20 20 20	870 Kč
<b>Euroline</b>	Euroimmun	Inhalation, pediatric inhalation Mediterranean inhalation Food Atopy Pollen-food cross reactions Pediatrics Insect venom	20 20 20 20 20 20 2	750 Kč
Allergoscan	Innogenetics	Inhalation Food	20 20	735 Kč
<b>Optigen</b>	Hitachi	Inhalation Food Atopy Universal	20 20 20 20	735 Kč
PolyCheck	Biocheck	Inhalation Food Pediatric aj.	20/10 20/10 20/10	550/385 Kč

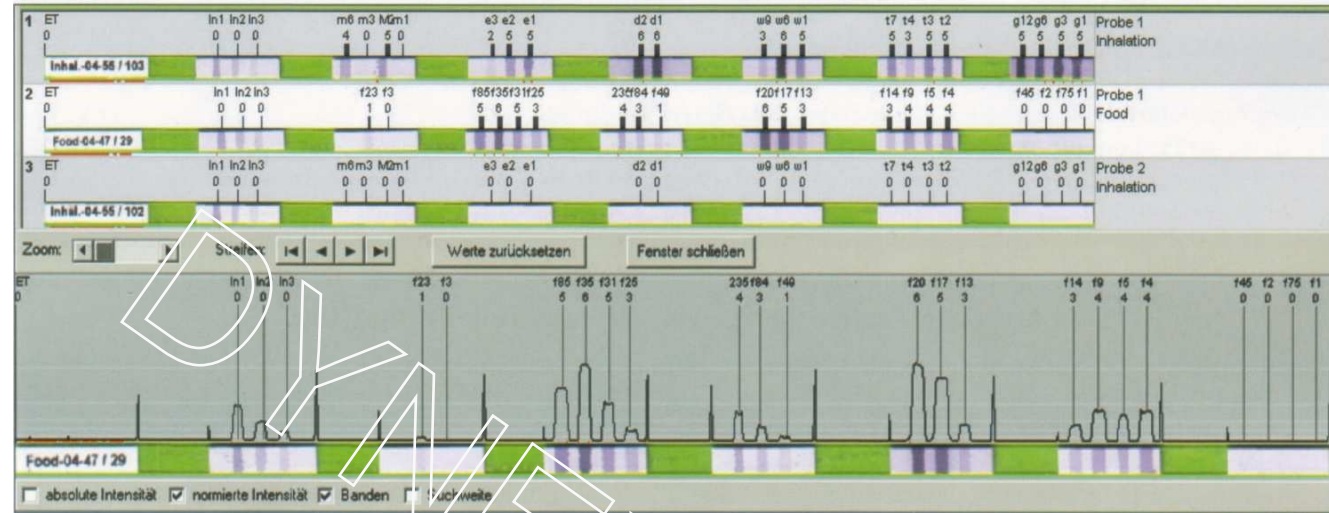
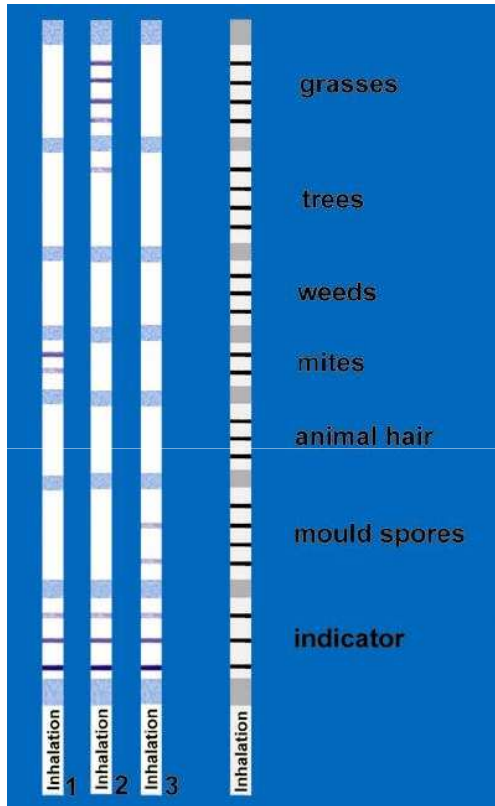
# Optigen systém Hitachi pro stanovení sp. IgE



<b>UNIVERSÁLNÍ PANEL 20</b>		<b>INHALAČNÍ PANEL 20</b>	<b>POTRAVINOVÝ PANEL 20</b>	<b>ATODY DANEL 20</b>
	<b>Alergeny</b>	<b>Alergeny</b>	<b>Alergeny</b>	<b>Alergeny</b>
	Positivní kontrola	Positivní kontrola	Positivní kontrola	Positivní kontrola
	Negativní kontrola	Negativní kontrola	Negativní kontrola	Negativní kontrola
1.	Břiza	1. Číše	1. Krab	1. Dermatoph. pteronyss
2.	Ambrosie	2. Líska - pyl	2. Treska	2. Dermatoph. farinae
3.	Bojíněk	3. Břiza bílá	3. Mrkev	3. Aspergillus fumigatus
4.	Pelyněk	4. Pelyněk černobýlý	4. Jablko	4. Cladosporium herbarum
5.	Latex	5. Bojíněk luční	5. Brambory	5. Kůň
6.	Sója	6. Žito	6. Rajske jabličko	6. Pes
7.	Rýže	7. Jitrocel kopinatý	7. Celer	7. Kočka
8.	Treska	8. Jasan	8. Broskev	8. Bojíněk
9.	Pšenice	9. Penicillium notatum	9. Vlašský ořech	9. Pelyněk
10.	Burský ořech	10. Alternaria alternata	10. Burský ořech	10. Břiza bílá
11.	Vaječný bílek	11. Cladosporium herbarum	11. Lískový ořech	11. Lískový ořech - pyl
12.	Kravné mléko	12. Aspergillus fumigatus	12. Mandle	12. Bílek
13.	Aspergillus fumigatus	13. Křeček	13. Sója	13. Mléko
14.	Cladosporium herbarum	14. Morče	14. Žito	14. Treska
15.	Alternaria alternata	15. Králík	15. Pšenice	15. Pšenice
16.	Pes	16. Kůň	16. Sezamové semínko	16. Sója
17.	Kočka	17. Kočka	17. Kasein	17. Burský oříšek
18.	Šváb	18. Pes	18. Mléko	18. Jablko
19.	Dermatoph. pteronyss	19. Dermatoph. farinae	19. Bílek	19. Mrkev
20.	Dermatoph. farinae	20. Dermatoph. Pter.	20. Žloutek	20. Latex



# Allergen-specific IgE EUROLINE



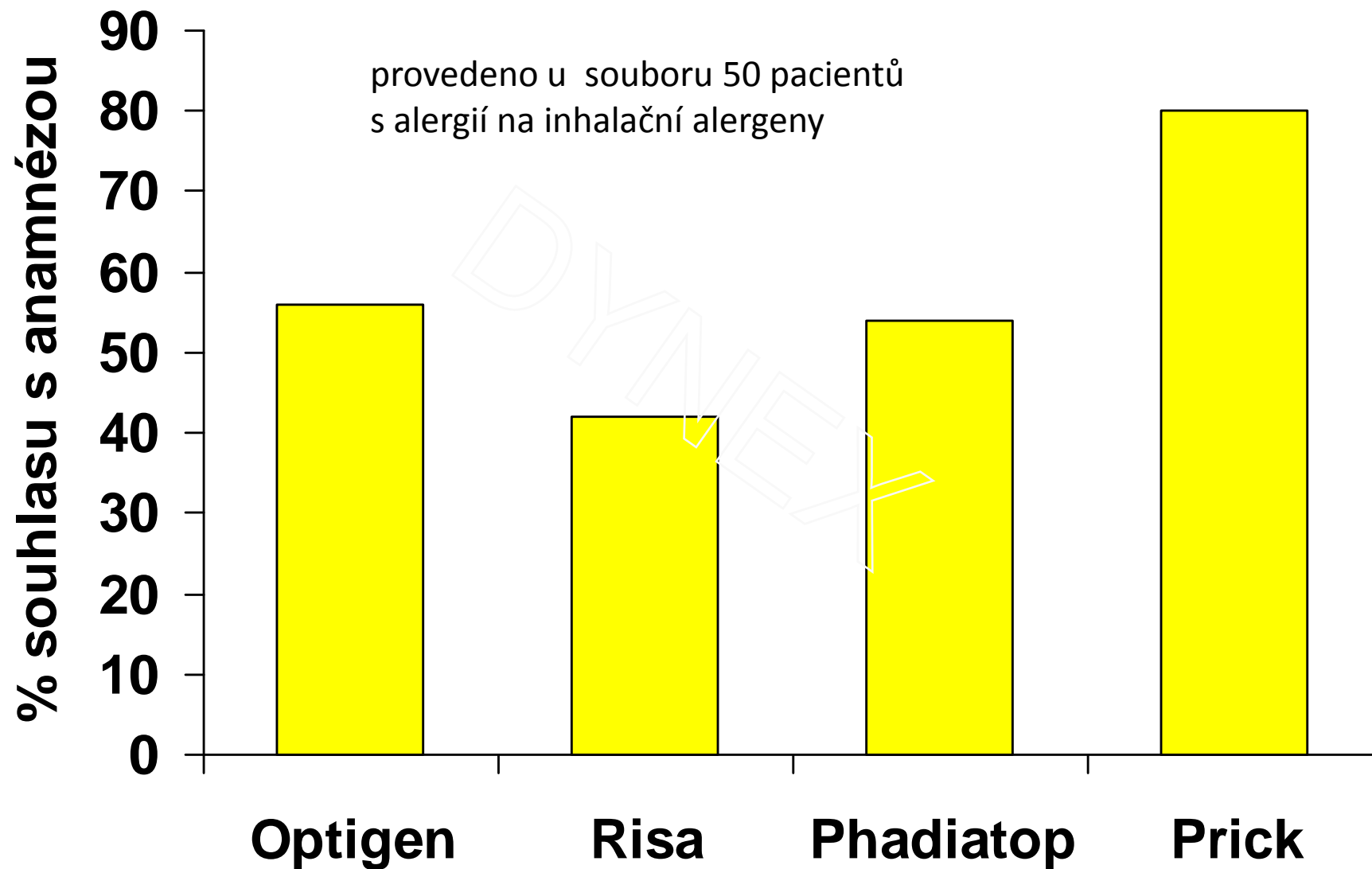
Allergen	g6 n=94	EUROIMMUN EUROLINE	
		positive	negative
Pharmacia	positive	64	7
CAP	negative	0	23

Sensitivity	90,1%
Specificity	100,0%

Pharmacia CAP	EUROIMMUN EUROLINE							
	0	1	2	3	4	5	6	
6	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	2	13	0	
4	0	0	0	2	6	9	0	
3	0	3	1	6	6	0	0	
2	4	6	4	4	0	0	0	
1	3	2	0	0	0	0	0	
0	23	0	0	0	0	0	0	
EAST-Klasse	0	1	2	3	4	5	6	

EAST-Klasse	Konzentration [kU/l]
0	< 0,35
1	0,35 - 0,7
2	0,7 - 3,5
3	3,5 - 17,5
4	17,5 - 50
5	50 - 100
6	> 100

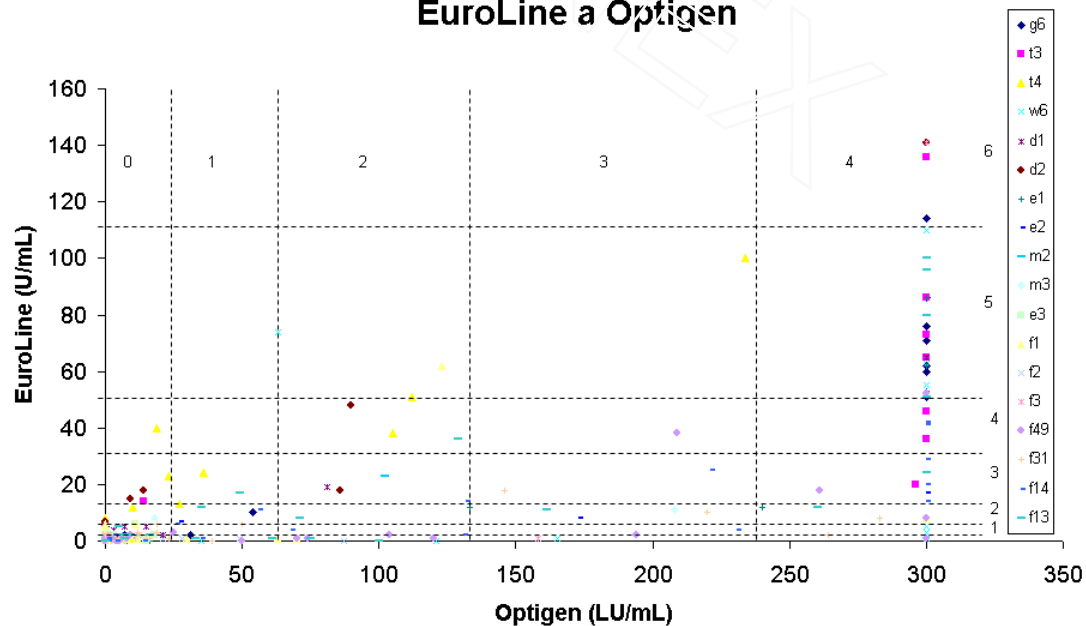
# Korelace vybraných testů s klinickým obrazem



## Srovnání výsledků stanovení sp.IgE metodou Optigen, Euroline a CAP

Srovnávané metody	n	senz	spec	efekt
Optigen/CAP	192	68,0	94,5	72,9
Euroline/CAP	45	61,5	84,2	71,1
Optigen/Euroline	301	76,0	87,1	83,4

**Korelace výsledků stanovení sp.IgE metodami  
EuroLine a Optigen**



# Dosavadní zkušenosti se systémem Optigen

- Spolupráce s výrobcem i dodavatelem dobrá
- Ke klinickému ověření nabídnuto 7 lékařům, využilo 5
- Za období ověřování srpen-říjen/2009 bylo 124 požadavků
- S výsledky byli seznámeni na XI. Beskydských AID 20.-21.11.2009
- Od poloviny roku 2010 nabízen oficiálně, 13 uživatelů a 1405 požadavků
- Pro rok 2011 Optigen zařazen do kontrolních cyklů SEKK SIE, zatím neakreditovaná metoda

panel	testování srpen – říjen 2009			2009	2010
	vyšetřeno	pomohlo	nepomohlo	vyšetřeno	vyšetřeno
Universal	30	29 (97%)	1 (3%)	104	363
Inhal	66	63 (94%)	4 (6%)	122	605
Food	19	13 (81%)	3 (19%)	39	382
Atopy	9	9 (100%)	0 (0%)	11	55
celkem	124	109 (94%)	7 (6%)	276	1405

# Přehled SEKK SIE 2007

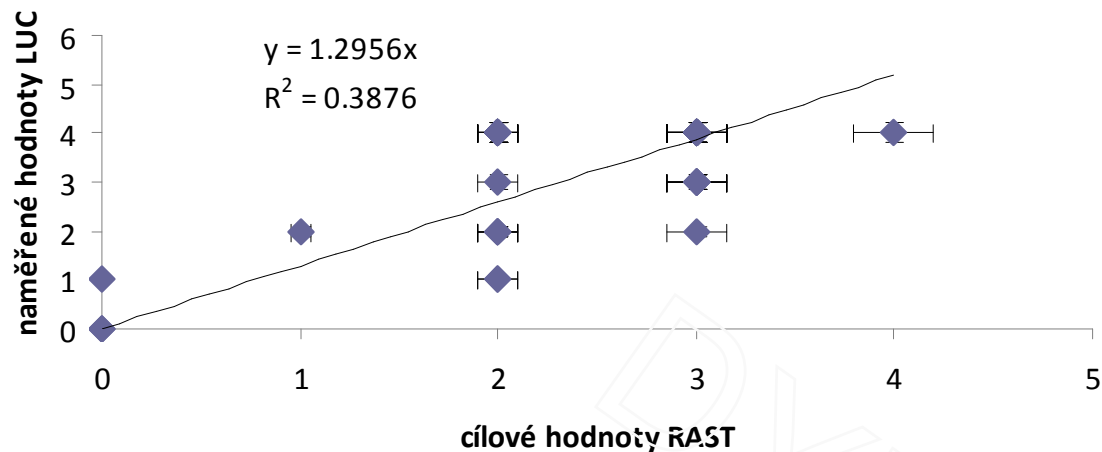
## Úspěšnost podle metod

	Phadia	DPC	RISA	Adaltis	Hycor	Advia	ostatní
n	48	48	48	48	48	48	48
mean	95	61	83	85	89	77	65
median	100	92	88	100	100	100	69
n1	11-13	19-29	15-17	3	5-9	4-1	8-12

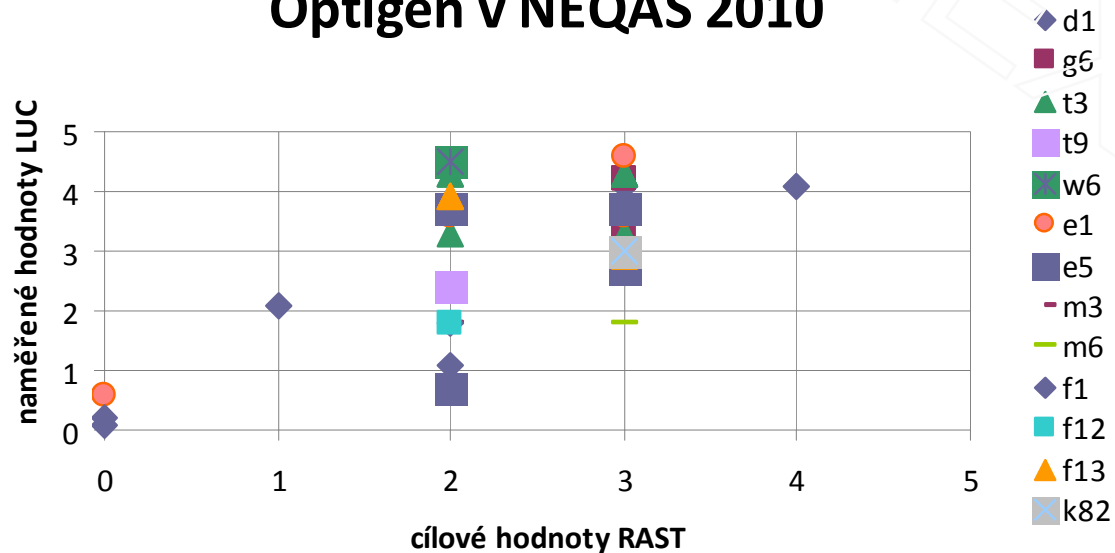
## Ostatní

	Radim Carla	R-Biopharm Ridascreen	Innogenetics Allergoscan	Euroimmun EuroLine	Hitachi Optigen	? Polycheck
n	48	48	45	42	8	
mean	91	60	62	38	25	
median	100	50	100	0	0	
N1	2	5-6	2	1	1	1
n1(2009)			1	2	2	1

## Optigen v NEQAS 2010



## Optigen v NEQAS 2010



	RAST/LUC	
	target	measured
mean	2,36	3,19
median	2	4
t-test (p)	0,0000003	

# **Kdy indikovat a aplikovat laboratorní vyšetření?**

**Panzner P.: Doporučení pro indikaci a provádění stanovení koncentrace specifických IgE protilátek.**

**Praktický lékař 1998, 78, 4, 183**

**Klinická imunologie a alergie 1999, 8, 2, 21-22**

**Laboratorní vyšetření je pro alergologa metodou první volby jen v omezeném množství případů !**

ANNALS OF  
**Allergy, Asthma  
& Immunology**

December 2008 • Volume 101, Number 6

**Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing:  
report from the American College of Allergy,  
Asthma and Immunology/American Academy of  
Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE  
Test Task Force**

Linda Cox, MD\*; Brock Williams, PhD†; Scott Sicherer, MD‡;  
John Oppenheimer, MD§; Larry Sher, MD||; Robert Hamilton, PhD||; and David Golden, MD#

~Official Publication of~  
**ACAAI**  
American College of Allergy, Asthma & Immunology  
[www.annallergy.org](http://www.annallergy.org)

I/LA20-A2  
Vol. 29 No. 9  
Replaces I/LA20-A  
Vol. 17 No. 24

Analytical Performance Characteristics and  
Clinical Utility of Immunological Assays for  
Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies  
and Defined Allergen Specificities;  
Approved Guideline—Second Edition

This document provides guidance for the design, analytical performance, standardization, quality assurance, and clinical application of laboratory assays used in the measurement of human IgE antibodies of defined allergen specificity.

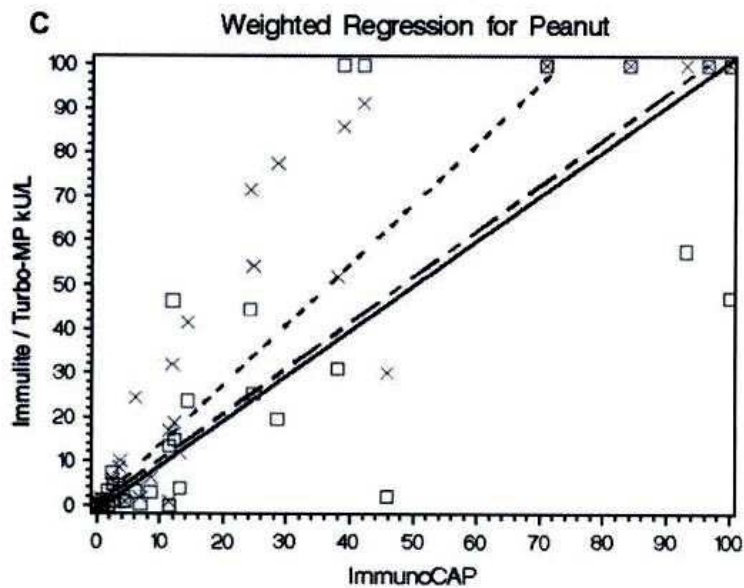
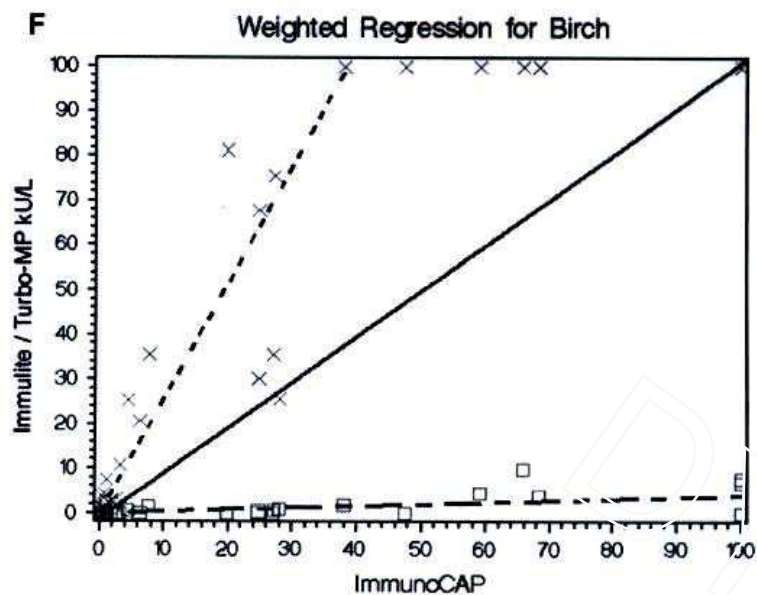
A guideline for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process.



dostupné na [www.clsi.org](http://www.clsi.org), vydáno 2009

# Závěry ACAAI, AAAAI a CLSI, 2008

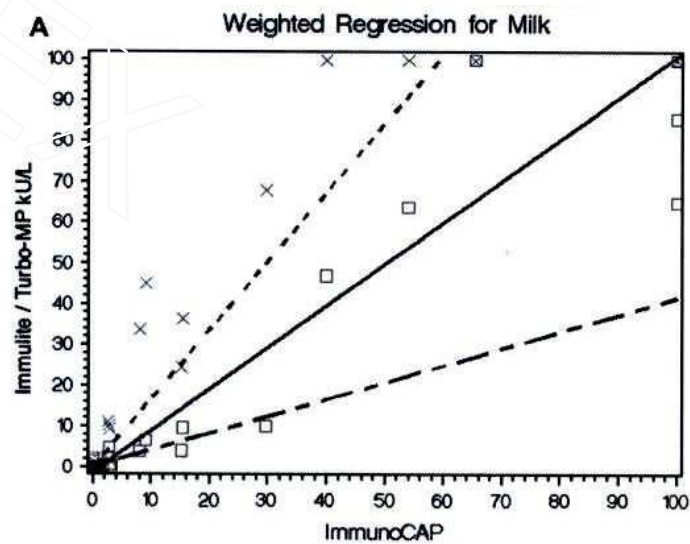
- stanovování sp.IgE dnes nelze ještě standardizovat
- není dostupný žádný mezinárodní referenční standard, který by dovoloval srovnání s nějakou cílovou hodnotou
- při stanovování sp.IgE existuje řada interferencí:
  - lidský RF, přirozeně se nacházející a terapeuticky aplikované anti-IgE protilátky a lidské anti-alergenové IgG protilátky přítomné ve vyšetřovaném vzorku
  - zkříženě reagující cukerné složky (CCDs) mohou způsobovat pozitivní IgE výsledky nejasného významu
- proto klinikovi musí být vždy známa a laboratoři vždy uváděna metoda, kterou bylo sp.IgE stanovováno
- žádný z testů na spec.IgE neposkytuje absolutní průkaz přítomnosti nebo nepřítomnosti alergického onemocnění
- jestliže diagnostický test nesouhlasí s anamnézou, opakuj ho, resp. použij jiný



----- Immulite  
 ..... Turbo-MP

Procento hodnot s diskrepancí > 20%  
 v Bland-Altmanově grafu

	Turbo-MP/CAP	Immulate/CAP
Mléko	46%	52%
Vejce	42%	64%
Burák	56%	60%
Kočka	20%	64%
D.farinae	52%	38%
Bříza	64%	60%



Převzato a upraveno podle Wang J. et al.: JACI 2008, 121(5), 1219-1224

# Významné panalergeny

## *PR-10 protein, Bet v 1 homologue*

- A heat labile protein, cooked foods are often tolerated
- Often associated with local symptoms such as oral allergy syndrome (OAS)
- Often associated with allergic reactions to fruit and vegetables in northern Eu

## *LTP (non-specific Lipid Transfer Protein, nsLTP)*

- A protein stable to heat and digestion causing reactions also to cooked foods
- Often associated with systemic and more severe reactions in addition to OAS
- Often associated with allergic reactions to fruit and vegetables in southern Eu

## *Profilin*

- Seldom associated with clinical symptoms but may cause demonstrable or even severe reactions in a small minority of patients

## *Storage protein*

- Protein found in seeds serving as source material during the growth of a new
- Often stable and heat-resistant proteins causing reactions also to cooked food

## *CCD*

- A marker for sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants
- Seldom associated with clinical symptoms but may cause demonstrable or even severe reactions in a small minority of patients

## *Tropomyosin*

- An actin-binding protein in muscle fibers
- A marker for cross-reactivity between crustaceans, mites and cockroach

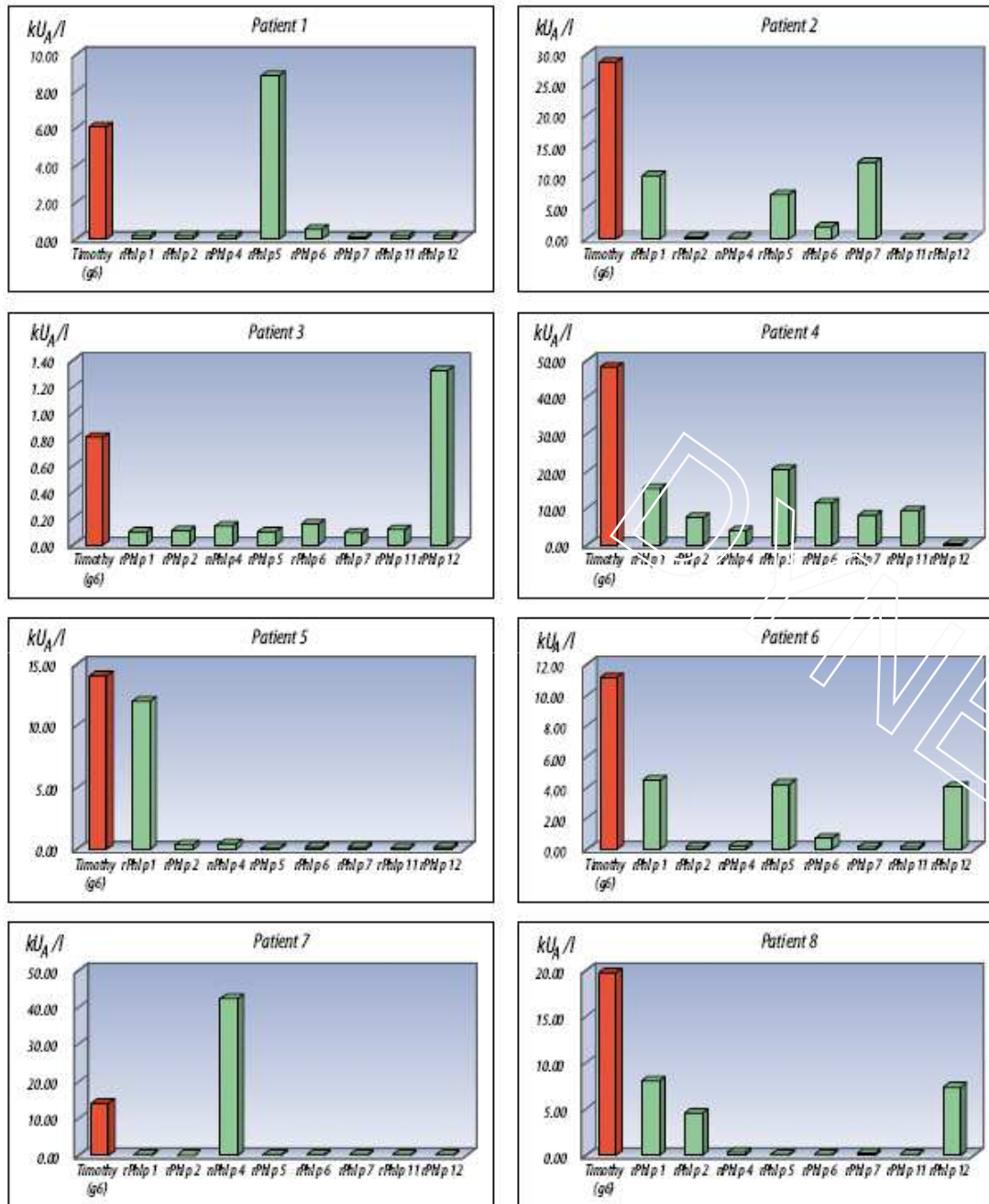
## *Parvalbumin*

- One of the major allergens in fish
- A marker for cross-reactivity among different species of fish and amphibians
- A protein stable to heat and digestion causing reactions also to cooked foods

## *Serum albumin*

- A common protein present in different biological fluids and solids e.g cows milk and beef, eggs and chicken
- Cross-reactions between albumins from different animal species are well known, for example between cat and dog and cat and pork

Převzato a upraveno podle Wall C.: <http://www.fffa.se/pp/komponenter0906.pdf>



Rozdíly v IgE  
protilátkových profilech  
ovlivňují klinické projevy  
a reaktivitu jednotlivých  
pacientů

podle Wall C.:

<http://www.fffa.se/pp/komponenter0906.pdf>

Figure 2. IgE antibody level to timothy pollen extract (*Phleum pratense* ■) in 8 grass pollen allergic patients, compared with their IgE antibody profile to 8 different timothy components (*Phl px* ■).

- není IgE jako IgE
- existují i jiné než FcεRI a jsou exprimovány i na jiných buňkách než basofilech a žírných buňkách
- ne všechny imunologicky podmíněné alergie jsou zprostředkovány výhradně přes IgE a jeho receptory

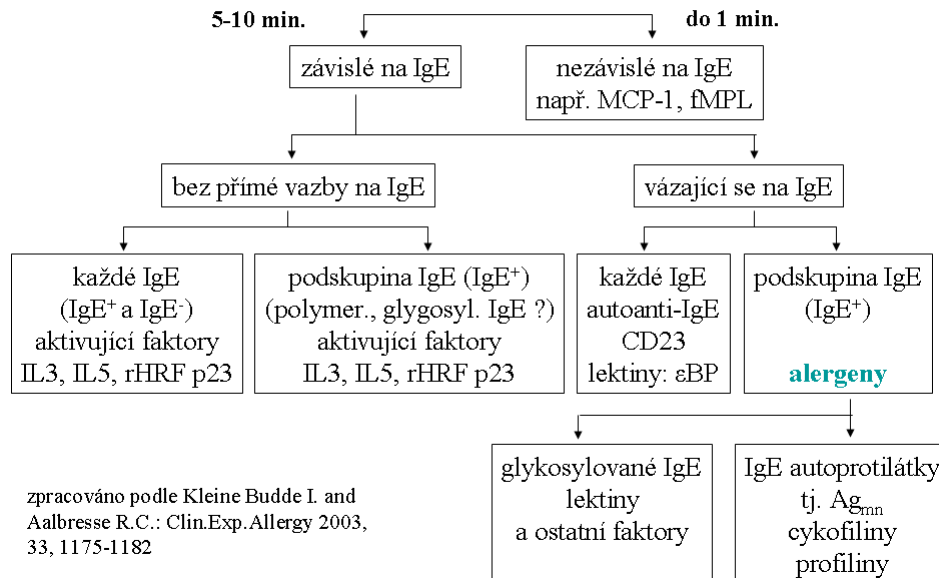
# IgE a jeho receptory

IgE Binding Receptors/Molecules

Name	Composition	Nature of Binding	Expression on cell type
High-affinity IgE receptor (FcεRI)	4 chains - α, β, γ tetrameric complex	α chain binds to the Fc fragment of IgE. Cε2-3. Only α chain is glycosylated. ITAM motifs on the β and γ chains are colored blue	Mast cells Basophils Eosinophils? Platelets?
Low-affinity IgE receptor (FcεRII, CD23)	Single type II membrane or soluble protein	Binding to Fc fragment of IgE. Cε2-4. Multimeric binding primarily	B cells Natural killer cells Macrophages Follicular dendritic cells Epithelial cells Langerhans cells Platelets Eosinophils Activated epithelial cells T cells Mast cells (human and mouse)
Galectin 3 (Gal3), IgE-binding protein (εBP), Mac-2	Single chain non-transmembrane lectin	Circulating protein, binds α chain of IgE via carbohydrate. Binds differentially to human α glycoforms	Monocyte/Macrophages (human and mouse) Neutrophils (human) Eosinophils (human) Langerhans cells (human) Dendritic cells (mouse) T cells (mouse, human) B cells (mouse) myeloid cells (human)

Podle Lochman I. a kol.: Autoantibodies, 2nd Edition, 2006

## Faktory vyvolávající uvolňování histaminu histamine-releasing factors (HRF)



zpracováno podle Kleine Budde I. and Aalbrisse R.C.: Clin.Exp.Allergy 2003, 33, 1175-1182

# Incidence

Frekvence výskytu onemocnění  
v časovém úseku

# Prevalence

Podíl populace trpící onemocněním  
v daném časovém období

# Positivní předpovědní hodnota

Podíl skutečně pozitivních výsledků testů mezi všemi  
pozitivními výsledky testů

# Sensitivita

Podíl pozitivních výsledků mezi nemocnými pacienty

# Negativní předpovědní hodnota

Podíl skutečně negativních výsledků testů mezi všemi  
negativními výsledky testů

# Specificita

Podíl negativních výsledků testů mezi **zdravými**

# Efektivita

Relativní počet správně klasifikovaných pacientů

definice		výsledky testu	
		+	-
onemocnění	+	A	B
bez onemocnění	-	C	D

$$\frac{A}{A + C}$$

$$\frac{A}{A + B}$$

$$\frac{D}{B + D}$$

$$\frac{D}{C + D}$$

$$\frac{A + D}{A + B + C + D}$$

**Děkuji za pozornost**