



## Equines allergenspezifisches IgE

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

Es wird vermutet, dass die atopische Dermatitis bei den meisten Tieren eine ähnliche Pathophysiologie aufweist. Bei Pferden ist die Krankheit noch nicht so gut erforscht wie bei anderen Spezies; dennoch bestehen diesbezüglich zwischen Pferden und anderen Spezies einige Ähnlichkeiten. Neben Juckreiz, welcher auch bei Pferden als Kardinalsymptom von Allergien gilt, zeigen viele Pferde rezidivierende Urticaria als einziges Symptom.

Die atopische Dermatitis wird als lebenslang andauernde Erkrankung angesehen, die eine langfristige Behandlung erfordert. Der Nachweis von allergen-spezifischem IgE bei Pferden unterstützt die Diagnose der Atopie, nachdem diese anhand von Krankengeschichte und klinischer Symptomatik sowie nach Ausschluss anderer Ursachen einer pruriginösen Dermatitis (bakterielle oder Pilzinfektionen, Parasiten, Futtermittel- oder Insektenallergie) gestellt wurde. Bei Hunden liefert die Bestimmung der IgE-reaktiven Allergene eine Leitlinie für die Vermeidung der verantwortlichen Allergene und/oder für die Immuntherapie<sup>1</sup>. Dieser Ansatz ist auch bei Pferden mit Erfolg verwendet worden<sup>2</sup>.

## 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 equinem IgE verwendet. Der bislang von IDEXX Laboratories angebotene Assay zum Nachweis von equinem IgE basierte auf der Fcε-Rezeptortechnik (rekombinantes humanes IgE-Epsilon-Rezeptorfragment).

Bereits zuvor veröffentlichte Daten von Studien mit Hunden haben deutlich die Gleichwertigkeit des Greer-Testsystems mit einem Testverfahren, bei dem das humane Fc-Rezeptorfragment verwendet wird, nachgewiesen<sup>3</sup>. Für die serologischen 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

Pferden hingegen verwendet das Greer-System ein gegen die Fc-Region des equinen 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, konnte eine gleichwertige Leistung festgestellt werden. Die angegebenen Daten sprechen eventuell für eine höhere Sensitivität des Greer-Assay zur Bestimmung des allergenspezifischen IgE.

## Methoden und Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurden 21 Pferdeseren analysiert.

### Experiment A:

Alle Proben wurden sowohl mit dem polyklonalen Nachweissystem von Greer (Standardprotokoll) als auch mit dem rekombinanten 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 (Anhang 1). Alle Ergebnisse wurden in ELISA-Milliextinktionen (ELISA milli absorbance units/EAU) mit Hintergrundkorrektur ausgedrückt. Reaktionen > 150 EAU wurden als positiv für das spezifische Allergen angesehen.

Zwei Pferdeseren wurden mit einem negativen Pool seriell verdünnt. Eine Probe der Verdünnungsreihe wurde mithilfe der zwei Assay-Systeme des Experiments analysiert (Anti-IgE

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Lorch et al (2001) Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantification by use of a radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy, *J. Am. Vet. Med. Assoc* 218: 1314 – 1322.

<sup>3</sup> 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.

mit Greer-Platten, Fc-Rezeptor mit Greer-Platten). Die zweite Probe wurde sowohl mit den beiden genannten Methoden als auch mit dem zuvor von IDEXX Laboratories angebotenen Testkit analysiert.

### Experiment B:

Zwanzig der 21 Pferdeseren (1 Probe hatte unzureichendes Volumen) wurden mit dem kompletten Testsystem, das sich des rekombinanten humanen Fc-Rezeptors bedient, getestet. Alle Proben wurden unter Verwendung desselben Allergen-Panels wie in Experiment A getestet und mit den kompletten Testkits nach den Anweisungen des Herstellers zur Testdurchführung analysiert.

## Ergebnisse und Diskussion

### Experiment A:

Bei Verwendung derselben ELISA-Platten, jedoch mit unterschiedlichem IgE-Nachweissystem, zeigte sich eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden (Tabelle 1).

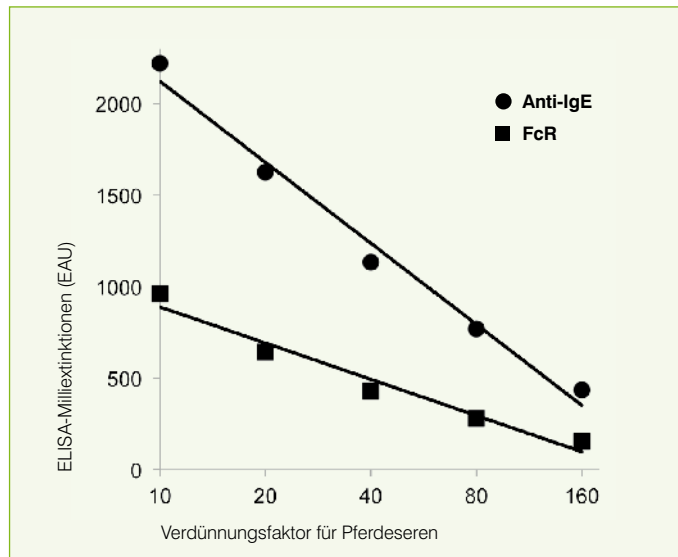
Bei 21 Proben und 40 Allergenen sowie insgesamt 840 Beobachtungen stimmten 80,6 % der Proben bei jedem Allergen überein. Innerhalb der einzelnen Allergenkategorien war die Übereinstimmung bei den Baum- und Umgebungs-Allergenen mit 88 % am höchsten, während sie bei den Gräsern mit 70 % und den Kräutern mit 76 % geringer war. Interessant war, dass die Diskordanzen nicht gleichmäßig verteilt waren, sodass die positiven Diskordanzen bei Anti-IgE dreimal höher waren als beim Fc-Rezeptor.

Dieser Unterschied mag auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Anti-IgE im Vergleich zum Fc-Rezeptor konsistent stärkere Signale lieferte. Dieser Signalunterschied war bei den zwei Pferdeseren, die seriell verdünnt und auf mit Grasallergenen beschichteten Platten getestet wurden, offensichtlich (Abbildung 1 und 2). In dieser begrenzten Studie war das Anti-IgE-Signal doppelt so stark wie das Fc-Rezeptor-Signal auf derselben Platte und fünfmal so stark als auf einer alternativen Platte (siehe Abbildung 2). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass diese begrenzte Verdünnungsreihe keine Parallelitäten zwischen Anti-IgE- und Fc-Rezeptor-Nachweis zeigte. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass Anti-IgE multiple Stellen der Fc-Region von IgE erkennt, während der Fc-Rezeptor nur an eine einzige Stelle bindet.

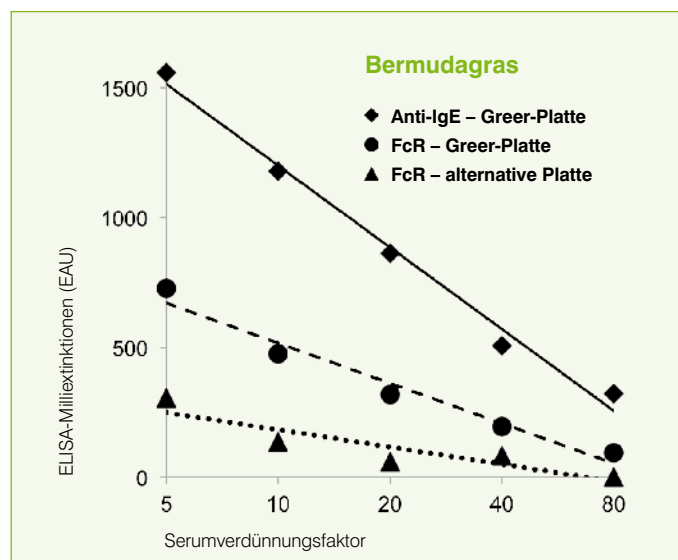
### Experiment B:

Bei Verwendung der zwei unterschiedlichen Assays (Greer Platte mit Anti-IgE bzw. alternative Platte mit Fc-Rezeptor) war die Konkordanz immer noch hoch. Bei 20 Proben und 40 Allergenen zeigten 77,7 % der Proben eine Übereinstimmung. Die Übereinstimmung innerhalb der einzelnen Kategorien war vergleichbar, wobei die Gräser die geringste (74,4 %) und die Umgebungs-Allergene die höchste (80 %) Konkordanz aufwiesen.

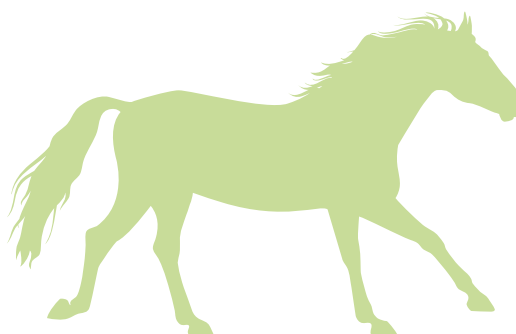
Wie im ersten Experiment zu beobachten war, gab es eine größere Anzahl an Anti-IgE-positiven Diskordanzen als Fc-positiven Diskordanzen.



**Abbildung 1:** Auswirkung der Verdünnung von Pferdeseren auf die Extinktion bei Verwendung einer ELISA-Platte mit gemischten Grasallergenen und zwei verschiedenen IgE-Nachweissystemen.



**Abbildung 2:** Auswirkung der Verdünnung von Pferdeseren auf die Extinktion bei Verwendung einer ELISA-Platte mit Bermuda-Gras-Allergenen und multiplen Reagenskombinationen (Anti-IgE mit Greer-Platte, Fc-Rezeptor mit Greer-Platte, Fc-Rezeptor mit alternativer Platte).



## Zusammenfassung

Diese Studie belegt die vergleichbare Eignung des Anti-IgE-basierten ELISA von Greer und des rekombinanten Fc-Rezeptor-basierten ELISA zur Messung von allergenspezifischem IgE bei Pferden. Diese Übereinstimmung zwischen den Testverfahren ist ein Ergebnis, das die Verwendung des Greer-Assay zum Testen equiner Atopiepatienten befürwortet. Der bei beiden Assays beobachtete Mangel an parallelen Dosis-Wirkungskurven für Gras-spezifisches IgE bei Pferden mag ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Tests IgE auf unterschiedliche 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 trat in der vorliegenden Studie klar zutage, da das Signal bei den Anti-IgE-Reagenzien von Greer generell stärker war. 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 den Assays bei Verwendung von Anti-IgE bzw. Fc-Rezeptor mit Greer-Platten zur Analyse von equinen Serumproben (n=21).

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – Greer Platte		
		ALLE Allergene	Negativ	Positiv
Negativ		535 63,7 %	40 4,8 %	575
Positiv		123 14,6 %	142 16,9 %	265
Gesamt		658	182	840

Konkordanz alle Allergene = 80,6 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – Greer Platte		
		Gräser	Negativ	Positiv
Negativ		97 46,2 %	6 2,9 %	103
Positiv		56 26,7 %	51 24,3 %	107
Gesamt		153	57	210

Konkordanz Gräser = 70,5 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – Greer Platte		
		Kräuter	Negativ	Positiv
Negativ		119 51,5 %	17 7,4 %	136
Positiv		38 16,5 %	57 24,7 %	95
Gesamt		157	74	231

Konkordanz Kräuter = 76,2 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – Greer Platte		
		Bäume	Negativ	Positiv
Negativ		252 85,7 %	14 4,8 %	266
Positiv		20 6,8 %	8 2,7 %	28
Gesamt		272	22	294

Konkordanz Bäume = 88,4 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – Greer Platte		
		Milben/ Pilze	Negativ	Positiv
Negativ		67 63,8 %	3 2,9 %	70
Positiv		9 8,6 %	26 24,8 %	35
Gesamt		76	29	105

Konkordanz Milben/Pilze = 88,6 %

**Tabelle 2:** Konkordanz der Ergebnisse zwischen kompletten Testkits mit Anti-IgE bzw. Fc-Rezeptor zur Analyse von equinen Serumproben (n=20).

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – alternative Platte		
		ALLE Allergene	Negativ	Positiv
Negativ	474 59,3 %	68 8,5 %	542	
Positiv	110 13,8 %	147 18,4 %	257	
Gesamt	584	215	799	

Konkordanz alle Allergene = 77,7 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – alternative Platte		
		Gräser	Negativ	Positiv
Negativ	90 45,2 %	4 2,0 %	94	
Positiv	47 23,6 %	58 29,1 %	105	
Gesamt	137	62	199	

Konkordanz Gräser = 74,4 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – alternative Platte		
		Kräuter	Negativ	Positiv
Negativ	108 49,5 %	21 9,5 %	129	
Positiv	28 12,7 %	63 28,6 %	91	
Gesamt	136	84	220	

Konkordanz Kräuter = 77,7 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – alternative Platte		
		Bäume	Negativ	Positiv
Negativ	213 76,1 %	39 13,9 %	252	
Positiv	19 6,8 %	9 3,2 %	28	
Gesamt	232	48	280	

Konkordanz Bäume = 79,3 %

Anti-IgE – Greer Platte		Fc-Rezeptor – alternative Platte		
		Milben/Pilze	Negativ	Positiv
Negativ	63 63 %	4 4 %	67	
Positiv	16 16 %	17 17 %	33	
Gesamt	79	21	100	

Konkordanz Milben/Pilze = 80 %

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

KRÄUTER	GRÄSER	BÄUME	MILBEN/PILZE
Gewöhnliche Spitzklette Ampfer/Sauerampfer Spitzwegerich Sommerzypresse Weißer Gänsefuß Rispenkraut Beifuß Amarant Beifußblättrige Ambrosie Dreilappige Ambrosie Russische Distel	Hundszahngras Wilde Mohrenhirse Kentucky Blue/Wiesenrispe Wiesenschwingel Knäuelgras Lolchgras Straußgras Acker-Trespe Ruchgras Lieschgras	Wachsgagel Birkenmix Eschenahorn/Ahorn Schwarzpappel Amerikanische Ulme Pecan Zuckerahorn Rote Maulbeere Amerikanische Weiß-Eiche Gelbkiefer Amerikanische Zitterpappel	Hausstaubmilbe Futtermilbe <i>Cladosporium sphaerospermum</i> Fusarium-Mix Penicillium-Mix

