

Autoimmun bullózisok laboratóriumi diagnosztikája

Doktori tézis

dr. Horváth N. Orsolya

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Sárdy Miklós, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Purebl György, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Gáspár Krisztián, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Komlósi Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mócsai Attila, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Sipos Ferenc, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2019

I. Bevezetés

Az autoimmun bullózisok diagnosztikája a rutin vizsgálómódszerek segítségével többnyire nem komplikált feladat, viszont gyakran látunk olyan esetet, ahol nem egyértelmű, határeseti fluoreszcencia látható a mikroszkópban és a klinikum sem tipikus. Ezen betegek diagnosztikája nem egyszerű, gyakran meg is kell ismételni a vizsgálatokat, ami így a diagnózis késéséhez és a beteg tüneteinek későbbi kezeléséhez vezet.

Az autoimmun bullózisok több csoportja ismert, a dolgozat a pemphigoid és a pemphigus csoport tagjaival foglalkozik. A bullosus pemphigoid (BP) a pemphigoid csoportba tartozik, mely jellemezhető a hemidesmoszómák ellenes antitestekkel és szubepidermális hólyagképződéssel. Ebbe a csoportba tartozik továbbá a pemphigoid vagy herpes gestationis, a nyálkahártya-pemphigoid, a lineáris IgA dermatózis és az epidermolysis bullosa acquisita.

A pemphigoid két legfontosabb autoantigénje a BP180 (XVII. kollagén, BPAG2) és a BP230 (dystonin-e, BPAG1). A pemphigoid gestationis olyan hólyagos bőrbetegség, mely terhesség folyamán vagy perinatálisan jelentkezik. Legfontosabb autoantigénje a BP180. Az epidermolysis bullosa acquisita nagyon ritka betegség, antigénje a VII-es típusú kollagén.

A pemphigus csoport két legfontosabb tagja a pemphigus vulgaris és a pemphigus foliaceus. A kután pemphigus vulgaris formákban desmoglein 1-, a nyálkahártya-domináns formákban desmoglein 3-ellenes antitestek játszanak jelentős patogenetikai szerepet.

A pemphigus foliaceus autoantigénje a desmoglein 1. Két domináns altípusa ismert: az endémiás fogo selvagem, ill. az Európában szinte kizárólagosan előforduló idiopathias pemphigus foliaceus.

Az autoimmun bullózus betegségeket többféle diagnosztikával vizsgáljuk.

A direkt immunofluoreszcencia a bullózus bőrbetegségek diagnosztikájának legfontosabb eszköze. A diagnózis egyes esetekben megfelelő klinikai kép és hólyagképződés, ill. tipikus mintázat megjelenése esetén akár pozitív szerológia hiányában is felállítható segítségével. A konkrét antigénről nem ad információt, de a lehetőségeket leszűkíti a kötődési mintázat alapján.

A direkt immunfluoreszcencia azon az elven alapszik, hogy a szövethez kötött antigéneket olyan antitesttel inkubáljuk, melyhez fluoreszceint kapcsoltunk korábban. Bullózus betegségek esetén lineáris fluoreszcenciát keresünk, ami vagy megszakítás nélkül jelen van a bazálmembrán teljes hosszában, vagy intraepidermálisan látható. Ez a fluoreszcencia többnyire IgG festéssel figyelhető meg, de minden esetben elvégezzük IgA-val is a kísérleteket.

Indirekt immunfluoreszcencia esetén a mintázat megegyezik a direkt immunfluoreszcenciával láthatóval. A technika abban különbözik, hogy nem a beteg bőrét, hanem a szérumát vizsgáljuk egy idegen szövet segítségével. Ez lehet majom, nyúl, tengerimalac és humán nyelőcső (pemphigus és pemphigoid), patkány és majom hólyag (paraneoplastikus pemphigoid), vagy amnion epithel (pemphigus és pemphigoid).

Az enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) az autoimmunbullózisok diagnosztikájának szenzitív és specifikus eszköze. A beteg szérumából a kit segítségével izolálhatunk konkrét antitesteket. A leggyakoribb ilyen antigének: a BP180, BP230, col7, dsg1 és desmoglein 3 (dsg3). Különböző gyártóknak többféle terméke kapható, így laboronként változó, melyiket használják, ill. melyik elérhető.

II. Célkitűzés

Munkánk során elsődleges célunk a bullózus autoimmun bőrbetegségek labordiagnosztikájának tökéletesítése, a szenzitivitás emelése volt.

Ehhez az alábbi kérdéseket fogalmaztuk meg és próbáltuk megválaszolni:

1. Az "Anti-SKIN profile test" mint új ELISA jobban teljesít-e a korábban elérhető kitéknél? Milyen előnyökkel, hátrányokkal jár a klinikai alkalmazása?
2. Lehet-e a komplement fixációs tesztet (CFT) használni bullosus pemphigoid diagnosztikájában? Javulnak-e tőle az eredmények, lehet-e tisztázatlan eseteket diagnosztizálni a segítségével?
3. Amennyiben az indirekt immunfluoreszcencia majom nyelőcsövön álnegatív, lehet-e IgG alosztályokat kimutatni a beteg szérumból? Növelhető-e így az indirekt immunfluoreszcencia szenzitivitása?
4. Az epidermis basalmembránja pemphigoidban nem mindig fluoreszkál vagy fluoreszcenciája kétes; lehet-e a mirigy kivezetőcsövek fluoreszcenciájának vizsgálatával mégis diagnózist felállítani?

III. Anyagok és módszerek

1. AntiSKIN profile test

178 szérumminta retrospektív analízisét végeztük az új ELISA, az AntiSKIN profile teszt segítségével. 138 beteg szérumát választottuk ki, akiknél bullózus autoimmun betegség diagnózisát állítottuk fel. A diagnózis minden esetben egyértelmű volt: a klinikai kép és a szövettan az adott betegségre jellemző volt, valamint legalább két egyéb diagnosztikai módszer pozitív volt a háromból, azaz direkt immunfluoreszcencia, indirekt immunfluoreszcencia (majom, nyúl nyelőcsövön, valamint sóhasított humán bőrön végezve), illetve egy specifikus ELISA. Mindegyik ELISA-t a gyártó (MBL) által megadott módon végeztük. A cut-off értékeket az MBL írta elő. A szürkezónás eseteket negatívnak tekintettük ebben a vizsgálatban. Minden szérum, mely álpozitív eredményt mutatott, két vagy három alkalommal lett tesztelve. A direkt és indirekt immunfluoreszcencia standard laboratóriumi eljárással került kivitelezésre.

Az AntiSKIN profile tesztet is a gyártó (MBL) instrukcióinak megfelelően használtunk. A cut-off 15 U/mL volt az ASPT minden tesztjére. Összesen 25 PF, 40 PV, 52 BP, 21 EBA, és 40 negatív kontroll szérumminta vizsgálatát végeztük el.

A rendelkezésünkre álló 313 BP szérumból 52-t használtunk fel, ezeknek a szérumoknak a szenzitivitás és specificitás eredményei megközelítőleg megegyeznek a 313 vizsgált minta korábbi értékeivel, viszont külön figyelemmel választottunk néhány határértéki szérumot, hogy a diagnosztikumok közötti esetleges eltéréseket detektáljuk.

Olyan betegeket választottunk ki kontrollnak, akiknél korábban autoimmun bullózus betegséget egyértelműen kizártunk.

2. A komplement fixációs teszt vizsgálata

Monocentrikus, retrospektív, szerológiai eset-kontroll klinikai vizsgálatot végeztünk 300 BP-s és 136 kontroll beteg bevonásával. A diagnózis minden esetben a klinikai képen alapult, kiegészítve további vizsgálatokkal, melyekből legalább 2 pozitív volt: hisztológia, direkt immunfluoreszcencia, indirekt immunfluoreszcencia, BP180 vagy BP230 ELISA. Az indirekt immunfluoreszcenciát pozitívként diagnosztizáltuk, amennyiben vagy majom, vagy nyúl nyelőcső, vagy humán sóhasított bőrrel vizsgálva pozitív volt. A tradicionális szövettan, a direkt és indirekt immunfluoreszcencia, a BP180 és BP230 ELISA (MBL) a laboratóriumunkban használatos standard eljárásokkal került kivitelezésre.

Minden BP és kontroll szérumot (beleértve 1 negatív és 1 pozitív belső kontrollt minden elindított tesztre) először 1:2 arányban hígítottunk 7,4-es pH-jú foszfát pufferrel (PBS), majd

ezzel inkubáltunk nem fixált, sóhasított, fagyasztva metszett, egészséges humán bőrből származó mintákat 30 percen át 37°C-on. Egy 3x10 perces, 0,005% Tween-20-t tartalmazó PBS oldatos mosást követően, 3 frissen levett humán szérum (olyan betegből, akinek nincs ismert autoimmun betegsége) keverékét készítettük elő komplementforrásnak. Ezzel a szérumkeverékkel inkubáltunk a metszeteket, de ezt megelőzően felhígítottuk 1:5 arányban barbitál pufferrel 30 percen át. Mosás után fluoreszcein isothiocianáttal (FITC) jelölt poliklonális nyúl anti-humán C3 komplement antitesttel inkubáltuk 1:100-hoz hígított PBS-ben 30 percen át, 37°C-os hőmérsékleten, meleg, párás környezetben (kamrában). Az utolsó mosást követően előkészítettük a metszeteket 2,5%-os 1,4-diazabicyclooctane, 0.1% nátrium azid, 10% PBS-t tartalmazó glicerinben mikroszkópos vizsgálatra. Pozitivitásként definiáltuk a lineáris C3 lerakódást a sóhasított bőr bazálmembránja mentén.

3. A majom nyelőcső vizsgálata indirekt immunfluoreszcenciával

64 bullosus pemphigoidban szenvedő beteg és 43 kontroll szérumának retrospektív analízisét végeztük el. A bullosus pemphigoid diagnosztikáját a korábban leírtaknak megfelelően végeztük el. Hogy a szerológiai alnegatív eseteket vizsgáljuk, minden kiválasztott szérum negatív volt majom és nyúl nyelőcső indirekt immunfluoreszcenciával vizsgálva. A kontrollbetegeknek különböző egyéb bullózus és gyulladós autoimmun betegségei voltak, s a pemphigoid minden esetben egyértelműen kizárható volt.

A laborunkban használt indirekt immunfluoreszcencia során a beteg szérumát először 1:20-hoz hígítjuk, majd nyúl és majomnyelőcsővön inkubáljuk. Ezt követően fluoreszcein isothiocianáttal jelölt anti-humán IgG-vel inkubáljuk.

IgG altípusok vizsgálatakor nonspecifikus kötődések elkerülése végett egy humán isoagglutinint neutralizáló anyagot használtunk a szérumokkal történő inkubáció előtt. A szérumokat 1:1-hez hígítottuk, majd 30 percig inkubáltuk a gyártó utasításai alapján. Ezután minden BP és kontroll szérum 1:10-hez lett hígítva PBS-ben (végső hígítás tehát 1:20), majd ezt inkubáltuk nem fixált, fagyasztva metszett nyúl és majom nyelőcsővön 30 percen át 37 °C-on. 3x10 perces, 0,005% Tween-20-t tartalmazó PBS (PBST) oldatos mosást követően 30 percen át, 37 °C-on PBST-ben 1:100-hoz hígított normál egérszérum használatával blokkoltunk. Ismételt mosás után hozzáadtuk a szekunder antitestet, egy monoklonális, anti-humán, FITC-jelölt IgG1-, IgG3- vagy IgG4-ellenes egér antitestet. Ezt megelőzően az antitest 1:64-hez került hígításra PBST-ben, majd 30 percig inkubáltuk vele a metszeteket sötét, párás kamrában. A szérumot teszteltük egy IgG autoantitest koktéllal is, amely IgG1, IgG3 és IgG4 keveréke volt, 1:64-es hígításban. Az utolsó mosást követően előkészítettük a metszeteket

2,5%-os 1,4-diazabicyclooctane, 0,1% nátrium azid, 10% PBS-t tartalmazó glicerinben mikroszkópos vizsgálatra. Akkor definiáltuk a metszetet pozitívnak, ha az adott IgG altípus a nyelőső bazálmembránjának legalább egyharmadán lineáris fluoreszcenciát mutatott az epithelialis és a mucosalis papillán is.

A BP180 és BP230 ELISA vizsgálatokat a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

4. Mirigykivezetőcsövek vizsgálata direkt immunfluoreszcencia segítségével

Monocentrikus eset-kontroll vizsgálatot végeztünk 64 BPs és 82 kontroll beteg bevonásával. A diagnózist a klinikum, hagyományos szövettan, immunpatológiai és szerológiai kritériumok alapján állítottuk fel.

Ahhoz, hogy egy mintát beválasszunk a vizsgálatba, az alábbi követelményeknek kellett megfelelnie: jól látható, folyamatos, lineáris fluoreszcencia IgG-vel a bazálmembrán mentén, verejtékmirigy-kivezetőcsövek jelenléte a metszeten, továbbá egyértelmű BP diagnózis. Olyan betegeket, akiknek nem volt egyértelmű a diagnózisa vagy nem volt mirigykivezetőcsöve a metszeten, kizártunk a vizsgálatból.

Az in vivo kötődött IgG antitesteket direkt immunfluoreszcencia segítségével vizsgáltuk a bőrben. Minden 10 µm-es, fagyasztott metszetet PBS-ben 1:30-hoz hígított, FITC-cel jelölt anti-humán kecske IgG-vel inkubáltunk 30 percig szobahőmérsékleten, sötét kamrában. A metszeteket nem blokkoltuk. Az intenzitást szemikvantitatív módon egy 0-4-ig terjedő skálán jelöltük (0, nincs fluoreszcencia; 4, legerősebb fluoreszcencia).

5. Statisztika

A szenzitivitás és a specificitás, valamint a pozitív és negatív prediktív értékeket minden esetben 95%-os konfidenciaintervallummal (CI) mutatjuk.

Mann-Whitney nem paraméteres, kétoldalas, kétmintás tesztjével hasonlítottuk össze az autoantitestek titereit az ANTI-skin profile teszt és a komplement fixációs teszt vizsgálatokor, valamint a mirigy-kivezetőcsövek intenzitásának vizsgálatokor. ASPT esetén a negatív és pozitív eredmények összehasonlítását Fisher egzakt tesztjével végeztük. A különböző tesztek szenzitivitás és specificitás értékeit McNemar teszttel vizsgáltuk.

A statisztikához használt szoftver: GraphPad Prism version 4.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, továbbá számolásokat végeztünk a GraphPad honlapján (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). A „receiver operating characteristic” (ROC) analízishez az SPSS 21.0-ás verziót, SPSS Inc., Chicago, IL, USA használtuk.

IV. Eredmények

1. A "MESACUP anti-Skin profile TEST" gyors és megbízható diagnosztikai eszköz

Az AntiSKIN profile teszt szignifikánsan gyorsabban végezhető el, mint korábbi ELISA-k, mivel az inkubációs idő csak 50%-a a specifikus MBL kiteknek, és mind az öt teszt elvégezhető egyidejűleg. Összességében a szérum csőbe pipettázásától az eredmények kinyomtatásáig kb. 1,8 óra telik el. Az ASPT elvégezhető akár csak 1 beteg szérumával is, mivel minden sor 8 csövet tartalmaz, 5 az autoantigéneknek, valamint 3 pozitív és negatív kontrolloknak. Tetszőleges számú beteg széruma vizsgálható egyidejűleg.

Az AntiSKIN profile teszt eredményei a laborunkban korábban elvégzett specifikus kitek eredményeivel 88,2% konkordanciát mutattak. Az eredmények minden betegség esetén szignifikánsan különböztek a beteg és a kontrollszérumban. A különbségek az ASPT és a korábbi tesztek eredményei között nem voltak szignifikánsak dsg1, dsg3, BP180, BP230, és a col7 teszt esetén (P=0,49, 0,62, 1,0, 0,32, és 0,34).

100% volt a specificitása a desmoglein 1-nek pemphigus foliaceus esetén, desmoglein 3-nak pemphigus vulgaris esetén, BP230-nak bullosus pemphigoidban, és a col7-nak epidermolysis bullosa acquisitaban szenvedő betegek szérumában. A BP180 specificitása 97,5% volt BP esetén. A BP180 és BP230 specificitása 100% volt a piacon korábban elérhető ELISA-tesztekkel. A többi ELISA esetén nem számoltunk specificitást, mivel biztosan 100% körüli értékek várhatóak. Az AntiSKIN profile tesztben a szenzitivitás 92,5% volt dsg3 esetén PV-ben, 92% dsg1 esetén PF-ben, 59,62% BP180 antitesteket vizsgálva, 61,4% BP230 antitestek esetén, valamint 80,95% col7 esetén. A korábbi MBL ELISA kiteket használva a következő szenzitivitás értékek jellemezték a mintát: 100%, 97,5%, 59,62%, 50,0% és 95,24% dsg1-re, dsg3-ra, BP180-ra, BP230-ra és VII-es típusú kollegénre vizsgálva. A BP180 és BP230 tesztek eredményei közösen vizsgálva az ASPT és a korábbi MBL ELISA tesztekre nézve 80,77% és 75% (specificitás: 97,5% és 100%).

Az ASPT teljesítménye tovább optimalizálható ROC görbe analízissel. A dsg1 szenzitivitása pemphigus foliaceus esetén megnövelhető 92%-ról 96%-ra a cut-off csökkentésével 15-ről 8,8 U/ml-ra, ami a specificitást nem befolyásolja, továbbra is 100% marad. A görbe alatti terület, "area under the curve", azaz AUC 0,962 volt. A dsg3 teszt még a dsg1-nél is jobban teljesít, a 100% specificitás megtartása mellett 95%-ra növelhető a szenzitivitás, ha a cut-off értékét 15-ről 10,2 U/ml-re csökkentjük; az AUC 0,992 volt. A cut-off értéke, 15 U/ml optimális volt a BP180 és a BP230 teszt esetén az AntiSKIN profile

tesztben. Az AUC értékek BP180 és BP230 antitestek esetén 0,870 és 0,838 voltak. A VII-es típusú kollagén teljesítménye az AntiSKIN profile tesztben szintén tovább növelhető a cut-off átállításával 11,6 U/ml-re, ami a szenzitivitás növekedését eredményezi 85,7%-ra, a specificitás csökkenése nélkül; az AUC 0,994 volt. Amennyiben tovább csökkentjük a cut-off értékét 9 U/ml-re, a szenzitivitás tovább növelhető 90,5%-ra, de ez az optimalizáció a specificitás csökkenését eredményezi 97,5%-ra.

2. A komplement fixációs teszt (CFT) jól használható bullosus pemphigoid diagnosztikájában

300 BP-s beteg szérumát használtuk a CFT-hez, összehasonlításként pedig 136 kontroll szérumot vizsgáltunk. A CFT pozitív volt 215 BP-s betegben, így a CFT szenzitivitása 71,7% volt. A teszt 85 BP-s betegben negatívnak bizonyult (28,3%). A szenzitivitás értékek DIF-re, BP180, BP230 ELISA-ra, majom és nyúl nyelőcső indirekt immunfluoreszcenciára, e kettőre együtt, valamint sóhasított bőrre nézve: 91,8%, 71%, 56,4%, 73,7%, 76,3%, 78% és 72,9%, ebben a sorrendben.

A CFT és BP230 ELISA szenzitivitása között szignifikáns különbséget találtunk ($P < 0,0001$), míg a CFT és a többi szerológiai teszt között nem volt ilyen különbség. A BP180 és BP230 autoantitestek titere szignifikánsan különbözött a BP-s és a kontroll betegek esetén.

Minden kontroll szérum negatív volt a CFT-ben, így a CFT specificitása 100% volt. A DIF, a BP180 ELISA, a BP230 ELISA, az indirekt immunfluoreszcencia majom, nyúl, majom és nyúl nyelőcsőben együtt, ill. sóhasított humán bőrön 98,6%, 97,5%, 98,3%, 100%, 98,5%, 98,5%, és 100% specificitást mutatott.

Habár minden szerológiai vizsgálat szenzitivitása 80% alatt volt, a BP180, BP230 és a CFT kombinált szenzitivitása 90,7%-nak adódott. A különbség abból ered, hogy a CFT 20 olyan bullosus pemphigoidos beteg szérumában volt pozitív a 46-ból (43,5%), akik mindkét ELISA-ban negatívak voltak. Amennyiben a CFT-t kombináljuk majom és nyúl nyelőcső indirekt immunfluoreszcenciával, a szenzitivitás 88,7%-ra emelkedik, mivel a CFT 31 esetben volt pozitív a 66 BP-s szérum esetén (47,0%), ahol az IIF negatívnak bizonyult nyelőcsövön. A CFT kombinációja minden szerológiai teszttel 95,3%-os szenzitivitást eredményez, mivel csak 5 olyan beteget találtunk a 14 BP-s betegből (35,7%), akik minden szerológiai teszttel negatívak voltak. Ezen felül a CFT 7 olyan BP-s beteg talált meg a 18-ból (38,9%), akiknél a direkt immunfluoreszcencia negatív volt.

3. Indirekt immunfluoreszcencia IgG altípusok használatával a bullosus pemphigoid diagnosztikájában

Mind a 64 BP-s szérum negatív volt a hagyományos indirekt immunfluoreszcencia technikával. Minden kontroll a laborunkban elérhető összes indirekt immunfluoreszcenciával, valamint a BP180 és BP230 ELISA-val negatív volt. A legtöbb BP-s szérum (57 a 64-ből; 89%) negatív volt a BP230 ELISA-ban, de 34 a 64-ből (53%) pozitív volt BP180 ELISA-val vizsgálva.

A direkt immunfluoreszcencia 59 (92,2%) BP-s betegben volt pozitív, 1 esetben negatív (1,5%); 4 (6,3%) esetben pedig nem volt elérhető. Direkt immunfluoreszcencia 9 kontroll beteg esetén volt elérhető (mivel nem volt célunk csak kutatási célra biopsziát venni a kontrollbetegekből), s ez mind negatív volt.

Határérték eredmények relatíve gyakoriak voltak a módszerünkkel. A 64 BP-s esetből, 9 (14,1%), 5 (7,8%), 1 (1,6%) és 11 (17,2%) mutatott határeseti fluoreszcenciát IgG1, IgG3, IgG4-gyel ill. az autoantitest koktéllal. A szenzitivitás és specificitás számolásához minden szérum vagy negatív, vagy pozitív kategóriához lett sorolva.

Az IgG1, IgG3, IgG4 és a hármas koktél használatával a 64 szérum közül 29 (45,3%), 12 (18,8%), 21 (32,8%) és 31 (48,4%) volt pozitív, mely számok a szenzitivitás értékeknek felelnek meg. A kontrollcsoportban mindössze egy álpozitív eredmény mutatkozott, az autoantitest koktéllal, így ez IgG1, IgG3 és IgG4 esetén 100%, míg a koktél esetén 97,7% specificitást eredményezett.

Az antitestkoktél nem korrelált pontosan az IgG altípusokkal kapott eredményekkel. Rendkívül érdekes, hogy 12 szérum a 64-ből (18,8%) negatív lett a koktéllal, de pozitív legalább egy IgG altípussal. Ez a jelenség megmagyarázható azzal, hogy az antitestkoktél használata intenzívebb háttérfestődést eredményezett. Ezzel ellentétes eredmény, hogy volt 4 olyan BP-s szérum (6,3%), amely csak az antitestkoktéllal volt pozitív. Mikor minden eredményt összesítettünk (pozitivitás: legalább egy IIF-ben pozitív, negativitás: minden IIF-ben negatív), 44 lett pozitív a 64 BP-s szérumból (68,8%), ami így 68,8% össz-szenzitivitást eredményezett 97,7% specificitás mellett.

A domináns autoantitest az IgG1 volt, melyet a 44 altípus-pozitív szérumból 29 betegnél tudtunk kimutatni (65,9%), ezt követte az IgG4 (21/44; 47,7%), ami viszont nem szignifikánsan különböző eredmény (P = 0,14). Az IgG3 IIF kevésbé volt használható, mint a többi, mivel ez az esetek csupán 27,3%-ban (12/44) fordult elő, és csak 4/44 (9,1%) minta volt csak ezzel az egy antitesttel pozitív. Összehasonlításként az IgG1 és IgG4 autoantitestek 9/44 ill. 7/44 (20,5%

és 15,9%), esetben voltak önmagukban pozitívak. Így, ha kivesszük az autoantitest koktélban pozitív szérumokat, a 40-ből 20 szérum (50%) festődött legalább egy antitesttel.

4. A verejtékmirigy-kivezetőcsövek használata korlátozottan alkalmazható bullosus pemphigoid vizsgálatára

58 bullosus pemphigoidban szenvedő és 44 kontroll beteg mintája mutatott lineáris fluoreszcenciát a kivezetőcsövek mentén. A verejtékmirigy-kivezetőcsövek fluoreszcenciája szignifikánsan intenzívebb volt BP-ben, mint a kontroll betegekben ($P < 0,0001$). A verejtékmirigy-kivezetőcsövek fluoreszcenciájának szenzitivitása és specificitása 90,6% és 46,3% volt BP-re nézve. Az intenzitás növekedésével csökkent a szenzitivitás, de nőtt a specificitás. A 3 és 4-es erősségű lineáris verejtékmirigy-kivezetőcső fluoreszcencia mutatta a legalacsonyabb szenzitivitást (31,2%) és a legmagasabb specificitást (97,5%). A mirigy-kivezetőcsövek fluoreszcenciája nem korrelált szignifikánsan a BP180 és BP230 értékekkel.

V. Következtetések

Az ASPT vizsgálatát valódi klinikai körülmények között végeztük el. Az ASPT kiváló szenzitivitás és specificitás értékekkel rendelkezik, gyors és helyettesítheti a külön-külön specifikus ELISA-kat. Az ASPT-n belüli BP230 teszt lényegesen jobban teljesített, mint a korábbi BP230 ELISA. Az ASPT inkubációs ideje csak a korábbi specifikus tesztek fele, és akár egyetlen egy beteg széruma is vizsgálható vele csövecskék pazarlása nélkül (nem kell összevární több szérumot, hogy gazdaságos legyen az elvégzése). Ez kiválóan alkalmassá teszi gyors tájékoztató diagnosztikára bármely bullosus autoimmun betegség gyanúja esetén. Továbbá az ASPT kiváló eszköz problémás szérumok vizsgálatára, overlap szindrómák diagnosztikájára, s alkalmas az esetleges epitóp terjedés felfedezésére is kontrollvizsgálatok alkalmával.

A CFT nem csak a herpes gestationis, hanem a BP diagnosztikájának is hasznos eszköze, a használatát olyan betegek esetén javasoljuk, akik vagy negatívak, vagy borderline pozitívak más szerológiai teszttel, illetve a DIF-fel. Magas specificitásából adódóan magas a teszt pozitív prediktív értéke, álpozitív esetek nem várhatóak. Emiatt a CFT különösen alkalmas határeseti diagnózisok megerősítésére és szerológiailag nem egyértelmű esetek tisztázására.

Két lépcsőben jelentősen növelhető az IIF szenzitivitása majomnyelőcsövön, ha a standard vizsgálatokkal negatív szérumokat a különböző IgG alosztályokkal is megvizsgáljuk. Kimutattuk, hogy leginkább az IgG1 és az IgG4, de az IgG3 alosztályú antitestek detektálása is növeli az IIF szenzitivitását majomnyelőcsövön a magas specificitás megtartása mellett. A használata így javasolható olyan BP-s szérumok vizsgálatára, melyek negatívak a hagyományos IIF-fel. További vizsgálatokat javaslunk viszont annak eldöntésére, hogy milyen antitestkombináció alkalmazható valóban költséghatékonyan a mindennapi diagnosztikában.

A dermis minden rétegében megjelenő, a verejtékmirigy-kivezetőcsöveket jellemző lineáris IgG fluoreszcencia szenzitív bullosus pemphigoidban, viszont csak az erős festődés elfogadhatóan specifikus. A dermis magasabb szakaszain specifikusabb a kivezetőcsövek festődése. Fragmentált minta esetén tehát nagy óvatossággal járjunk el, diagnózis egyelőre nem alapulhat kizárólag a verejtékmirigy-kivezetőcsövek vizsgálatán.

X. Saját publikációk jegyzéke

Első szerzős eredeti közlemények:

1. **Horváth ON**, Varga R, Kaneda M, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. Diagnostic performance of the "MESACUP anti-Skin profile TEST". Eur J Dermatol. 2016; 26:56-63.

Első szerzős összefoglaló közlemények:

1. Horváth ON, Jankásková J, Walker A, Sárdy M. Pemphigoid diseases. Autoimmune diseases in the elderly. Hautarzt. 2015; 66:583-8.

Társszerzős eredeti közlemények:

1. Jankásková J, **Horváth ON**, Varga R, Ruzicka T, Sárdy M. Complement Fixation Test: An Update of an Old Method for Diagnosis of Bullous Pemphigoid. Acta Derm Venereol. 2016; 96:197-201.

2. Sinem Bağcı I, **Horváth ON**, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. Diagnostic Value of Linear Fluorescence Along the Basement Membrane of Sweat Gland Ducts in Bullous Pemphigoid. Acta Derm Venereol. 2017; 97:622-626.

3. Jankásková J, **Horváth ON**, Varga R, Arenberger P, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. Increased sensitivity and high specificity of indirect immunofluorescence in detecting IgG subclasses for diagnosis of bullous pemphigoid. Clin Exp Dermatol. 2018; 43:248-253.

Társszerzős összefoglaló közlemények:

1. Bağcı IS, **Horváth ON**, Ruzicka T, Sárdy M. Bullous pemphigoid. Autoimmun Rev. 2017; 16:445-455.

Egyéb, a disszertációban fel nem használt első szerzős publikációk:

1. **Horváth ON**, Kapsler C, Sárdy M. Horváth ON, Kapsler C, Sárdy M. [Inflammatory diseases of oral mucous membranes]. Hautarzt. 2016; 67:786-792.

2. **Horváth ON**, Borovaya A, Roider E, Klose J, Hartlieb E, Waschke J, Ruzicka T, Sárdy M. Successful methotrexate treatment of oesophageal pemphigus vulgaris in an immunosuppressed patient with Crohn's disease. Acta Derm Venereol. 2015; 95:868-869.

3. **N Horváth O**, Letulé V, Ruzicka T, Herzinger T, Goldscheider I, von Braunmühl T. Periocular discoloration after using a prostaglandin analog for eyelash enhancement: evaluation with reflectance confocal microscopy. J Cosmet Dermatol. 2017; 16:18-20.

4. **Horváth ON**, von Braunmühl T, Sárdy M. Lineare IgA/IgG-Dermatose des Kindes. [Pediatric linear IgA/IgG dermatosis]. Hautarzt 2018; 69:28-30.

Egyéb, a disszertációban fel nem használt társszerzős publikációk:

1. Sárdy M, Borovaya A, **Horváth ON**, Folwaczny C, Schmitt W, Schmidt T, Hertl M, Ruzicka T. Successful rituximab treatment of juvenile bullous pemphigoid with esophageal scarring due to epitope spreading. J Dtsch Dermatol Ges. 2016; 14:618-21.
2. Jankáskova J, **Horváth ON**, Walker A, Sárdy M. Autoimmunserologie und direkte Immunfluoreszenz sichern die Diagnose. Hautnah dermatologie. 2015; 31:24-7.
3. Bağcı IS, Ruini C, Niesert AC, **Horváth ON**, Berking C, Ruzicka T, von Braunmühl T. Effects of Short-Term Moisturizer Application in Different Ethnic Skin Types: Noninvasive Assessment with Optical Coherence Tomography and Reflectance Confocal Microscopy. Skin Pharmacol Physiol. 2018; 31:125-133.
4. Walter E, Vielmuth F, Rotkopf L, Sárdy M, **Horváth ON**, Goebeler M, Schmidt E, Eming R, Hertl M, Spindler V, Waschke J. Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. Sci Rep. 2017; 7:3579.