

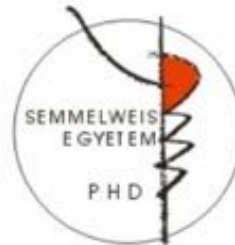
Autoimmun bullózisok laboratóriumi diagnosztikája

Doktori értekezés

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
I. Bevezetés	6
1. Autoimmunbullózisok	6
1.1 Bullosus pemphigoid (BP)	6
1.1.1 A bullosus pemphigoid klinikai variánsai	6
1.1.2 A bullosus pemphigoid pathogenezeise	12
1.1.3 A bullosus pemphigoid diagnosztikája.....	14
1.2 Pemphigoid gestationis	17
1.3 Epidermolysis bullosa acquisita	20
1.4 Pemphigus vulgaris (PV)	21
1.5 Pemphigus foliaceus (PF)	23
1.6 A pemphigoid csoport egyéb tagjai.....	25
1.6.1 Anti-p200 pemphigoid.....	25
1.6.2 Lineáris IgA dermatózis	25
1.6.3 Brunsting-Perry pemphigoid, dyshidrosiform pemphigoid és egyéb ritkaságok.....	26
2. Autoimmunbullózisok diagnosztikájában használt vizsgálómódszerek.....	26
2.1 Direkt immunofluoreszcencia	26
2.2 Indirekt immunfluoreszcencia	29
2.3 ELISA	30
2.4 Szövettan	31
2.5 Immunoblot	32
II. Célkitűzések	33
III. Anyagok és módszerek	34
1. AntiSKIN profile test.....	34
2. A komplement fixációs teszt vizsgálata.....	35
2.1 Betegek, szérumok	35
2.2 A komplement fixációs teszt menete	35
3. A majom nyelőcső IIF vizsgálata	36

3.1 Betegek.....	36
3.2 Indirekt immunfluoreszcencia.....	36
3.3 Direkt immunfluoreszcencia	37
3.4 Indirekt immunfluoreszcencia IgG altípus antitestekkel.....	37
3.5 ELISA	38
4. Mirigykivezetőcsövek vizsgálata direkt immunfluoreszcencia segítségével	38
4.1 Betegek.....	38
4.2 Direkt immunfluoreszcencia vizsgálat.....	39
5. Statisztika.....	39
IV. Eredmények.....	41
1. A "MESACUP anti-Skin profile TEST" gyors és megbízható diagnosztikai eszköz	41
2. A komplement fixációs teszt (CFT) jól használható bullosus pemphigoid diagnosztikájában.....	49
3. IIF altípusok használatának lehetősége a BP diagnosztikájában	53
4. A mirigykivezetőcsövek vizsgálata	56
4.1 BP180 és BP230 vizsgálata.....	56
4.2 Az adnexumok fluoreszcenciája.....	56
4.2.1 A VMK fluoreszcenciája	56
4.2.2 A verejtékmirigy-kivezetőcsövek vizsgálata a papilláris dermisben	59
4.2.3 A VMK fluoreszcenciája a középső dermisben	59
4.2.4 A VMK fluoreszcenciája a dermis mélyebb részein	60
4.2.5 A szórtüszők fluoreszcenciája	60
4.2.6 A verejtékmirigyek fluoreszcenciája.....	60
V. Megbeszélés	62
1. A "MESACUP anti-Skin profile TEST" vizsgálata.....	62
2. A komplement fixációs teszt vizsgálata.....	63
3. Az IgG alosztályok vizsgálata	64
4. A VMK vizsgálata	65
VI. Következtetések.....	68
VII. Összefoglalás	69
VIII. Summary.....	70

IX. Irodalomjegyzék.....	71
X. Saját publikációk jegyzéke.....	82
XI. Köszönetnyilvánítás	84

Rövidítések jegyzéke

ASPT: MESACUP anti-Skin profile TEST

AUC: area under the curve

BP: bullosus pemphigoid

BM: bazálmembrán

CI: konfidenciaintervallum

CFT: komplement fixációs teszt

col7: VII-es típusú kollagén

col4: IV-es típusú kollagén

C3: hármas típusú komplement

dsg1: desmoglein 1

dsg3: desmoglein 3

DIF: direkt immunfluoreszcencia

EBA: epidermolízis bullóza acquisita

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FITC: fluoreszcein isothiociánát

IIF: indirekt immunfluoreszcencia

LAD: lineáris IgA dermatózis

MT-ATP8: mitokondriálisan kódolt ATP szintetáz 8 gén

PBS: phosphate buffered saline

PG: pemphigoid gestationis

PF: pemphigus foliaceus

PV: pemphigus vulgaris

ROC: Receiver operating characteristic

VMK: verejtékmirigy-kivezetőcső

I. Bevezetés

Az autoimmunbullózisok 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.

Dolgozatom célja, hogy a lehetséges diagnosztikai eszközök tárházát kibővítsük, leírjuk a hatékonyságukat, s bemutassuk, hogy pontosan milyen alkalmazhatósági feltételekkel használhatjuk őket. A dolgozat tehát abban a reményben készült, hogy minimalizáljuk azon betegek számát, akiket nem tudunk egyértelműen diagnosztizálni, s a helyes diagnózist gyorsabban és biztosabban lehessen felállítani.

1. Autoimmunbullózisok

1.1 Bullosus pemphigoid (BP)

A bullosus pemphigoid a pemphigoid csoportba tartozik, mely jellemezhető a hemidesmosomák ellenes antitestekkel és szubepidermális hólyagképződéssel. Ebbe a csoportba tartozik a BP, pemphigoid vagy herpes gestationis (PG), nyálkahártya-pemphigoid, lineáris IgA dermatózis (LAD), epidermolysis bullosa acquisita (EBA) és egyéb ritka variánsok (Baum és mtsai, 2014). Eredendően az idős kor megbetegedése, és gyakorisága gyorsan emelkedik a nyugati társadalmakban. Habár a BP ritkán életet veszélyeztető betegség, emelkedett mortalitás és morbiditás társul hozzá a terápia mellékhatásaitól függetlenül is.

A pemphigoid két legfontosabb autoantigénje a BP180 (XVII. kollagén, BPAG2) és a BP230 (dystonin-e, BPAG1).

1.1.1 A bullosus pemphigoid klinikai variánsai

A klasszikus BP egy hólyagképződéssel járó bőrbetegség, viszont a jelenlegi klinikai tapasztalat alapján - talán a bőrgyógyászok fokozottabb figyelme és a könnyebben elérhető diagnosztika miatt - gyakrabban találkozunk eltérő klinikai képpel.

A BP klinikai megjelenése polimorf. A betegség többnyire egy nem-bullosus, viszkető fázissal kezdődik, mely pár napig megmarad, és sokszor csak az egyetlen tünete a BP-nek (Di Zenzo és mtsai, 2007). Ebben az időszakban urtikária-szerű, elvakart, ekcematizált plakkok, vagy akár prurigo-szerű csomók is jelentkezhetnek (Lamb és mtsai, 2006). A klasszikus BP folyadékkal telt, 1-3 cm átmérőjű, serosus vagy haemorrhagiás hólyagokkal jellemezhető. A tipikus kép megfigyelhető a 1. ábrán. A hólyagok erythémás, vagy normál bőrön fordulhatnak elő (Cozzani és mtsai, 2015), és erős viszketéssel járnak. A betegség szimmetrikus eloszlású, a predilekciós helyek a has alsó része, a végtagok flexor felszínei, ágyék és a hónalj (Walsh és mtsai, 2005). A hólyagok többnyire heg nélkül gyógyulnak, de nem minden esetben. Jellemző a milium-képződés a mélyebb antigén-érintettség esetén. Ezt a jelenséget a 2. ábra mutatja.



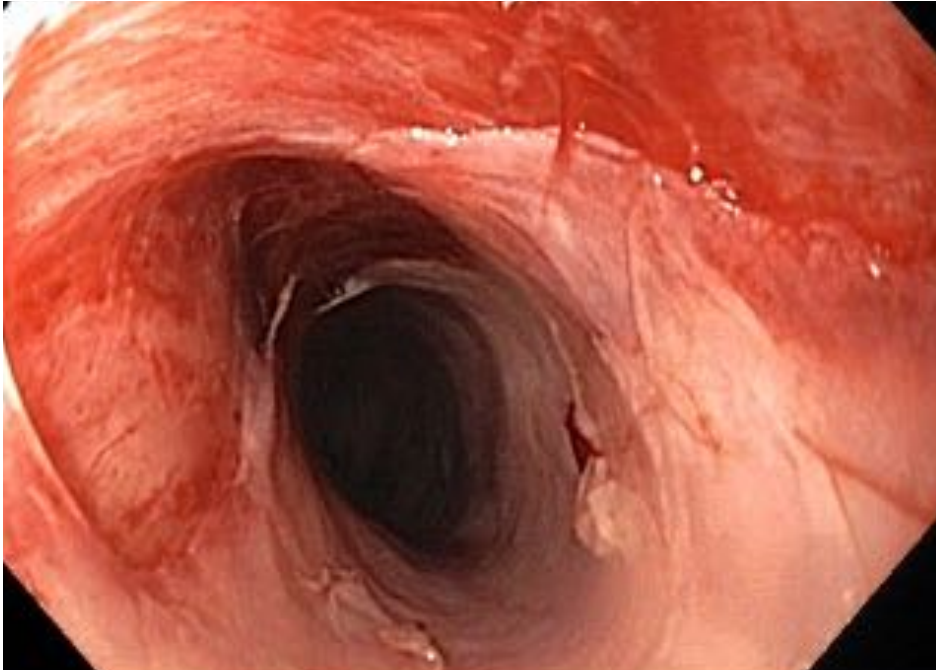
1. ábra: a bullosus pemphigoid tipikus klinikai képe haemorrhagiás és szerózus folyadékkal telt hólyagokkal és erosiókkal.



2. ábra: Miliumképződés egy anti-p200 pemphigoidos beteg térdén

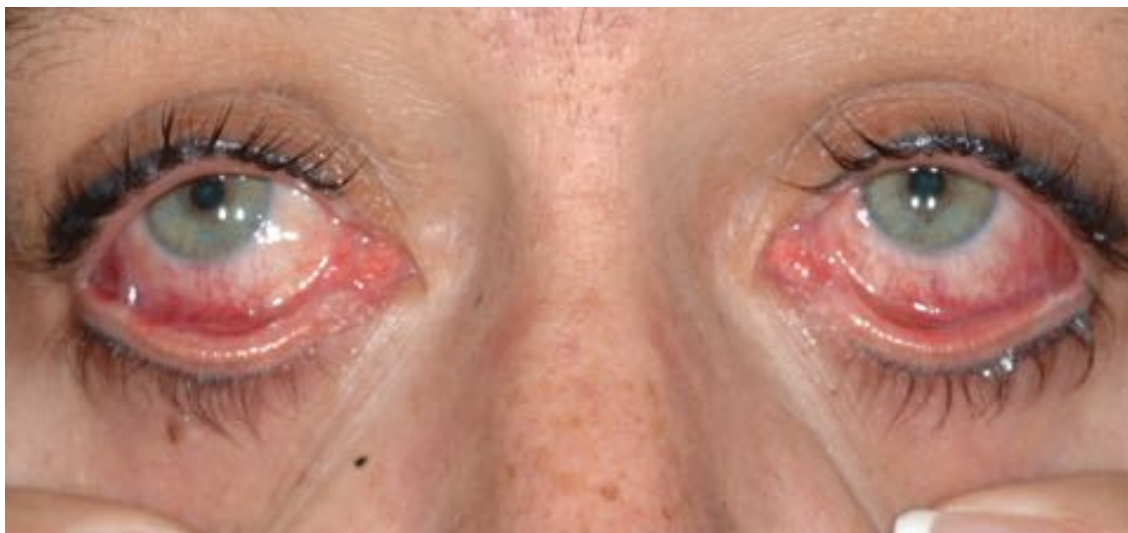
A BP az esetek 10-25%-ában nyálkahártyákat is érinthet. Leggyakrabban a szájnálkahártya, de a konjunktíva, orr, garat, nyelőcső, anogenitális régió is mutathat tüneteket (Di Zenzo és mtsai, 2008). Nyálkahártya-érintettség a 3. ábrán kerül bemutatásra, a nyelőcsőben jól láthatóak a hólyagok. A betegség lefolyása többnyire

krónikus, spontán remissziókkal és exacerbációkkal, de a pemphigoid nyálkahártya-érintettséggel is spontán gyógyulhat pár év alatt. Az olyan esetekben, amelyekben az oesophagus is érintett vagy a látást, sőt esetleg az életet veszélyeztető hegesedés figyelhető meg, lényegesen agresszívebb terápiát szükséges bevezetni.



3. ábra: nyelőcső érintettség bullosus pemphigoidban

A BP-t nem szabad összekeverni a nyálkahártya-pemphigoiddal, mely terápiarezisztens, lényegesen hosszabb ideig tart a gyógyulása, és hegesedéssel, funkcióvesztéssel járhat. Az egyik legsúlyosabb variánst, az okuláris pemphigoidot a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: súlyos szemérintettség, symblepharon képződés és gyulladás

A BP nem bullózus variánsát nonbullosus cutan pemphigoidnak nevezték el (Bakker és mtsai, 2014). A betegek kb. 20%-ában nem jelennek meg hólyagok, csak más aspecifikus tünetek (Bakker és mtsai, 2013). Az ekcémás variánst is erős viszketés jellemzi, de hólyagok helyett ekcéma-szerű plakkok láthatók (Jeong és mtsai, 1995), ahogy az 5. ábra is mutatja.



5. ábra: Ekcéma-szerű erythemás plakkok bullösus pemphigoidban

A noduláris pemphigoid viszkető, prurigó-szerű csomókkal jelentkezik a végtagok disztális részén, hólyagok nem jellemzőek. Amennyiben mégis előfordulnak, akkor vagy a csomók megjelenése előtt/után azonos helyen, vagy a bőr más részein láthatóak (Di Zeno és mtsai, 2012), ahogy a 6. ábra is mutatja.



6. ábra: erythemás csomók prurigót utánozó bullosus pemphigoidban

1.1.2 A bullosus pemphigoid pathogenezise

A bullosus pemphigoid pathogenezise még nincs teljes részletességgel feltárva. Valószínűleg genetikai predispozíció és triggerfaktorok együttese okozza. Ismert, hogy a 2 fő antigén a XVII-es kollagén és a dystonin-e, de a dystonin-e patogenetikai szerepe még vitatott. Habár dystonin-e (BP230) ellenes IgG és IgE antitestek találhatóak a legtöbb beteg szérumában, ezen titerek nem korrelálnak a betegség aktivitásával (Yoshida és mtsai, 2006; Delaporte és mtsai, 1996). BP230 ellenes autoantitestek leginkább kevésbé súlyos, főleg ekcéma képében jelentkező pemphigoid formákban fordulnak elő (Zeng és mtsai, 2009).

A XVII-es kollagén (BP180) ellenes autoantitestek patogenitását állatmodellekben is igazolták (Liu és mtsai, 1993). A nem-kollagenózus 16A (NC16A)

domain reprezentálja az immunodomináns régiót, mely azokat a major epitópokat tartalmazza, melyet felismernek a T és B sejtek (Thoma-Uszynski és mtsai, 2006). Nemcsak T és B sejtek, hanem neutrophil granulocyták, macrophagok és hízósejtek is szükségesek a betegség kifejlődéséhez (Chen és mtsai, 2002).

A BP180 ellenes IgG (főképp IgG1 és IgG4) autoantitestek mennyisége és a betegség aktivitása közötti korreláció bizonyított (Schmidt és mtsai, 2000; Tsuji-Abe és mtsai, 2005). Klasszikus BP-ben főképp IgG1 kötődik a BP180 NC16A domainhez (Hofmann és mtsai, 2002). Egy vizsgálat azt bizonyította, hogy IgG4 autoantitestek akár blokkolhatják is az IgG1 és IgG3 kötődését a BP180-hoz, így gátló hatást fejtenek ki (Zuo és mtsai, 2016). Ezen felül IgE szerepét is felvetették BP-ben, Messingham és mtsai (2009) szerint a begék 77%-ában jelen vannak NC16A domain ellenes IgE antitestek.

A BP genetikai predispozíciója egyelőre nem bizonyított, erre irányuló kutatások jelenleg is zajlanak. Jelenleg ismert viszont, hogy a major hisztokompatibilitási génkomplex II. osztály (MHC II) HLA-DQB1*0301 gyakran jelen van BP-ben és nyálkahártyapemphigoidban (Delgado és mtsai, 1996; Chan és mtsai, 1997). Ezen felül egy német kutatócsoport kimutatta, hogy a mitokondriálisan kódolt ATP szintetáz 8 gén (MT-ATP8) valószínűleg részt vesz a BP pathogenezisében (Hirose és mtsai, 2015), ami a mitokondriális rendellenességek szerepét is felveti. Ezen felül a hemidezmoszómák érzékenységének növekedése is megfigyelhető reaktív oxigén származékokra olyan sejtekben, melyek hordozzák az MT-ATP8 mutációt (Grando és mtsai, 2015). Más kutatások a CYP2D6, egy citokróm P450 izoenzim gén polimorfizmusának (CYP2D6*3/CYP2D6*4 genotípus) nagyobb gyakoriságát mutatták ki, melynek gyógyszerindukált BP-ben lehet szerepe (Rychlik-Sych és mtsai, 2015).

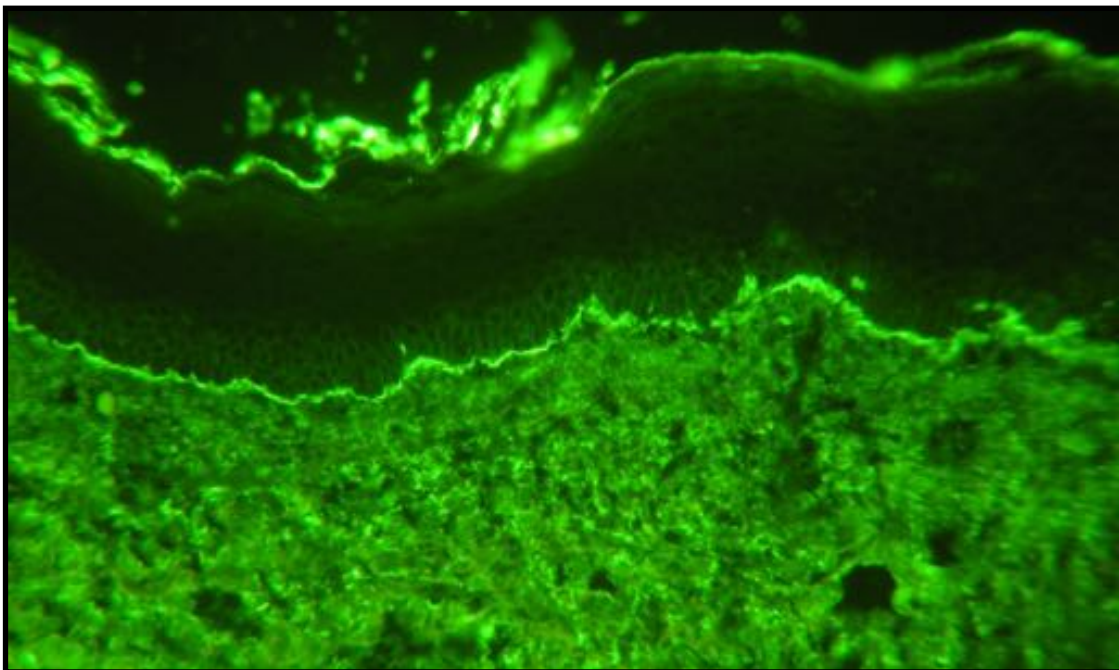
Egyelőre ismeretlen mechanizmussal, de a BP indukálható gyógyszerrel, védőoltással, fizikai ágensekkel, vírusfertőzésekkel, UV- ill. röntgen-sugárzással, viszont a betegek csupán 15%-ában találjuk meg a kiváltó faktort (Venning és mtsai, 1995). A gyógyszerindukálta BP a gyógyszer megvonása után gyorsan gyógyul (Vassileva és mtsai, 1998), viszont a gyógyszer által triggerelt nem reagál a gyógyszer megvonására, lefolyása pedig megegyezik a klasszikus BP-jével. A BP-t indukáló gyógyszerek valószínűleg hapténokként funkcionálva a lamina lucida fehérjéihez kötődnek és megváltoztatják ezek antigenitását (Ruocco és mtsai, 1991). Más

gyógyszerek pedig vagy tartalmazzak, vagy kibocsátanak szulfhidryl csoportokat (penicillamin, captopril, penicillin és annak derivátjai, furoszemid, cephalosporinok). Ezen kívül phenolgyűrűt tartalmazó gyógyszerek (ASS, cephalosporin), angiotenzin-konvertáló enzim inhibitorok, NSAID-ok, ill. egyéb immunmodulátorok, pl. vakcinák, gliptinek, valamint TNF α -gátlók is okozhatnak pemphigoidot (Ruocco és mtsai, 1991; Béné és mtsai, 2016).

1.1.3 A bullosus pemphigoid diagnosztikája

A bullosus pemphigoid diagnosztikájának a klinikum szempontjából legfontosabb elemei a DIF, az indirekt immunfluoreszcencia (IIF), ill. az enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

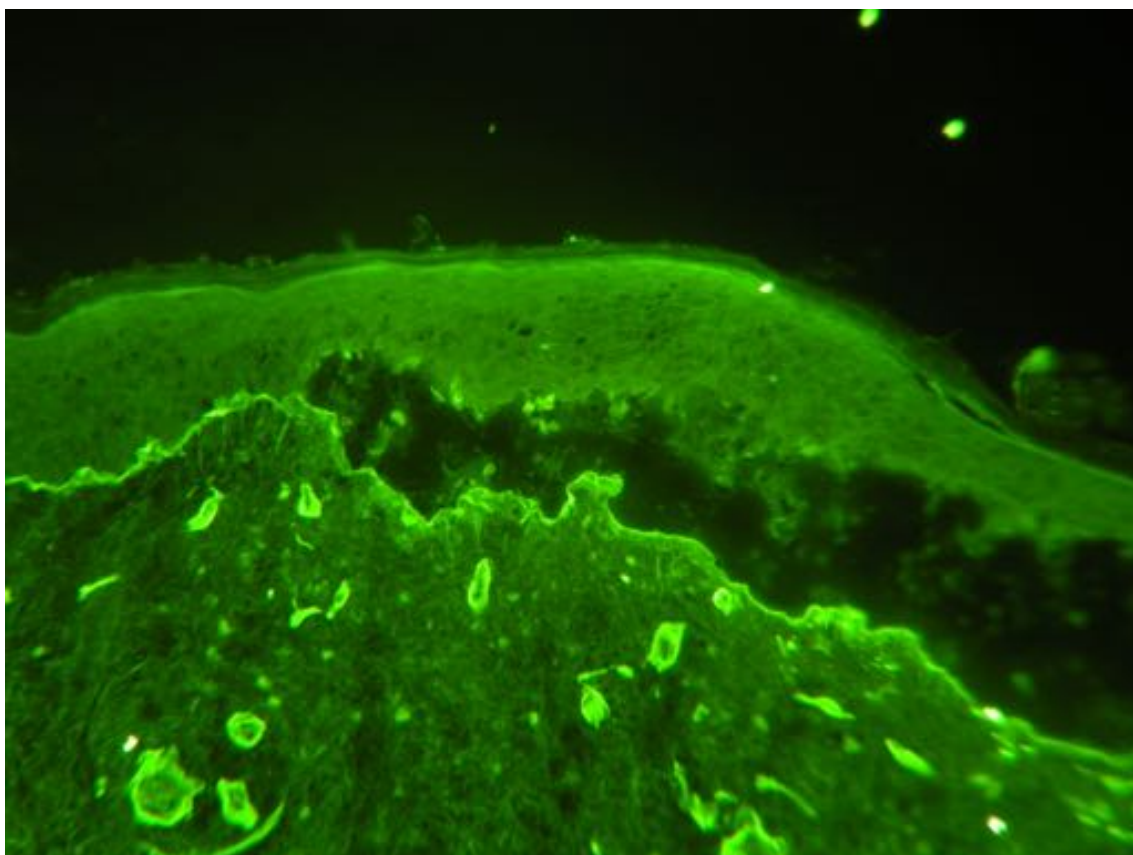
Direkt immunfluoreszcenciával (DIF) lineáris IgG felrakódást láthatunk a bazálmembrán mentén, ehhez társulhat hármas típusú komplement (C3) valamint IgA is, ahogy fentebb ismertettük. Egy tipikus, pozitív DIF felvételt a 7. ábra mutat. Lineáris festődés még 2 másik betegségben is előfordulhat: pemphigoid gestationis (PG) ill. EBA esetén.



7. ábra: Lineáris IgG csapadék a bazálmembrán teljes hosszában

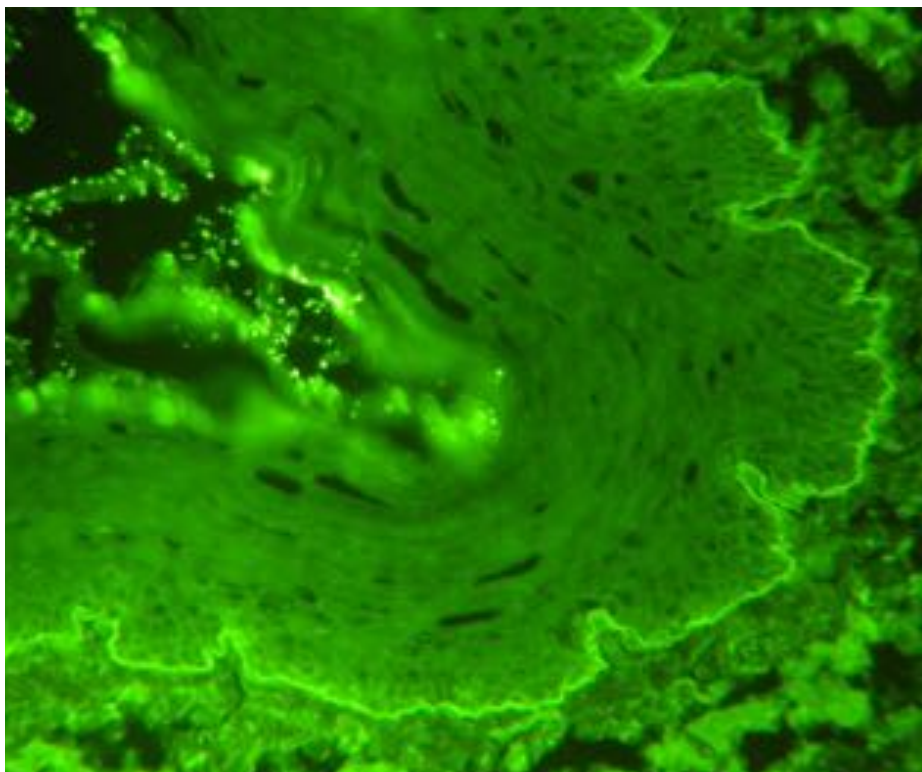
Amennyiben a mintán megfigyelhető hólyagképződés, IV-es típusú kollagén (col4) segítségével még tovább differenciálhatjuk az antigént. A col4 a BP180 és BP230

alatt, de a col7 felett helyezkedik el, így, amennyiben a hólyagképződés felette található, a hólyag alján, EBA esetén pedig a hólyag tetején található. BP képét a 8. ábra mutatja.



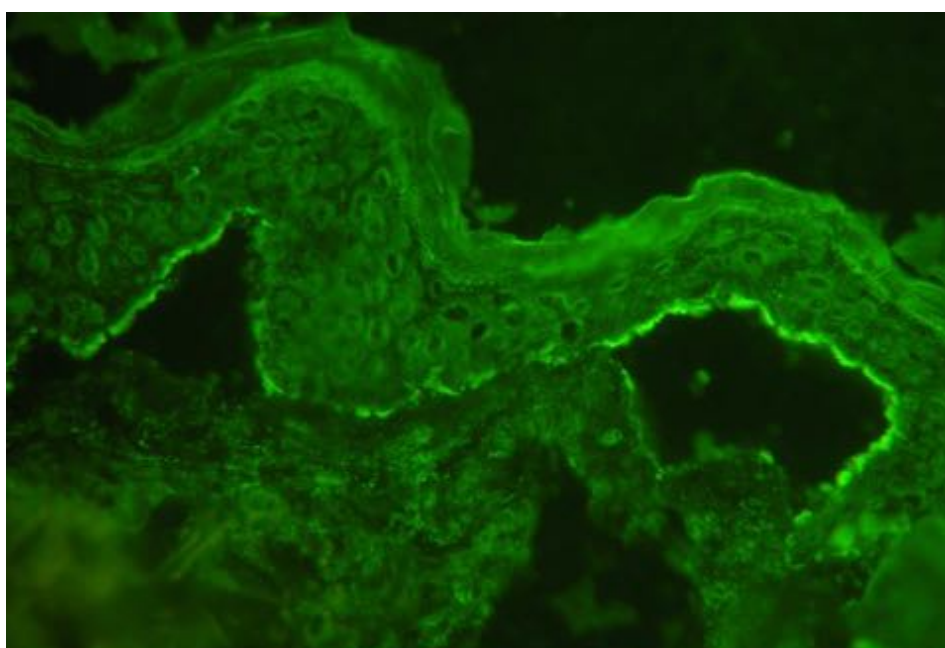
8. ábra: Col4 a hólyag alján, tehát hólyagképződés a két fő BP antigén magasságában található, diagnózis: BP

A DIF-fel párhuzamosan indirekt immunfluoreszencia (IIF) vizsgálatot is végzünk, a mi laboratóriumunkban nyúl, ill. majom nyelőcsövön. Ez is lineáris festődést mutat IgG jelöléssel, ahogy a 9. ábra is demonstrálja.



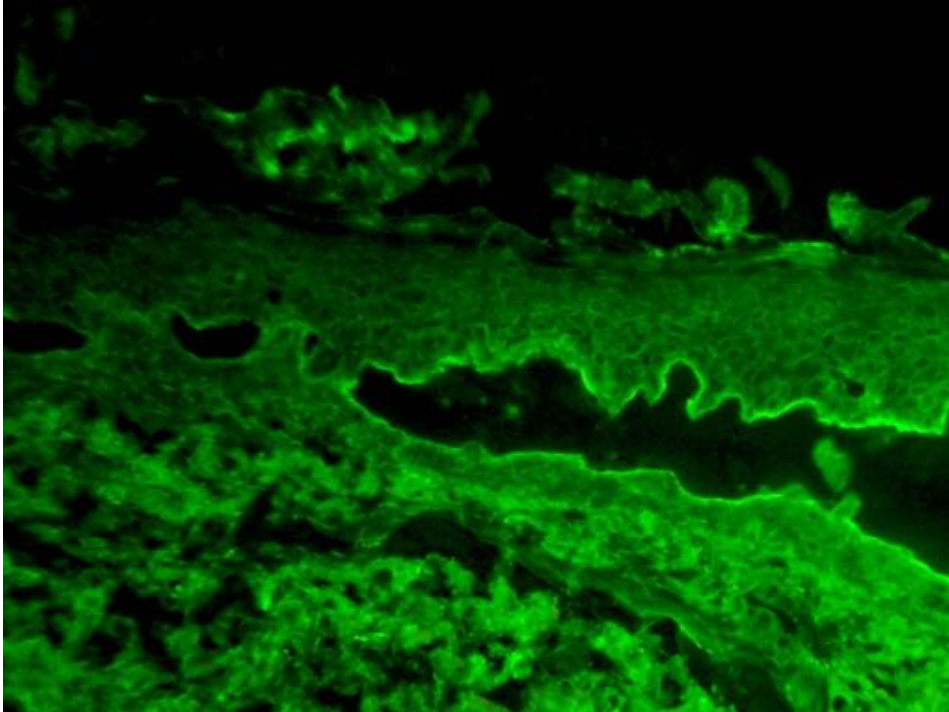
9. ábra: Majom nyelőcső lineáris IgG festődése bullosus pemphigoidban

A következő vizsgálat a humán sóhasított bőr indirekt immunfluoreszcenciája. Ez lineáris festődést kell, hogy mutasson a kialakult hólyagok (intra lamina-lucida) epidermális felszínén, ahogy megfigyelhető a 10. ábrán is.



10. ábra: BP lineáris IgG festődéssel a hólyag tetején.

A 11. ábrán egy olyan fluoreszcencia látszik, mely a membrán alján és tetején is megjelenik. Amennyiben ilyen fluoreszcenciát látunk, és a klinikum nem egyértelmű, fontos, hogy nyálkahártya-pemphigoidra is gondoljunk.



11. ábra: Nyálkahártya-pemphigoid, lineáris festődés a hólyag tetején és alján.

A konkrét antigén meghatározásához a klinikai rutinban ELISA-t használunk, ami laborunkban a BP180 és a BP230 meghatározása történik. Ezzel a diagnosztikával az esetek jelentős részében felállítható a helyes diagnózis. Az eredeti mintavételnél nemcsak DIF, hanem szövettan is készül. Ez többnyire önmagában nem diagnosztikus, de határeseti kérdésekben a diagnózis felállításához vezet.

1.2 Pemphigoid gestationis

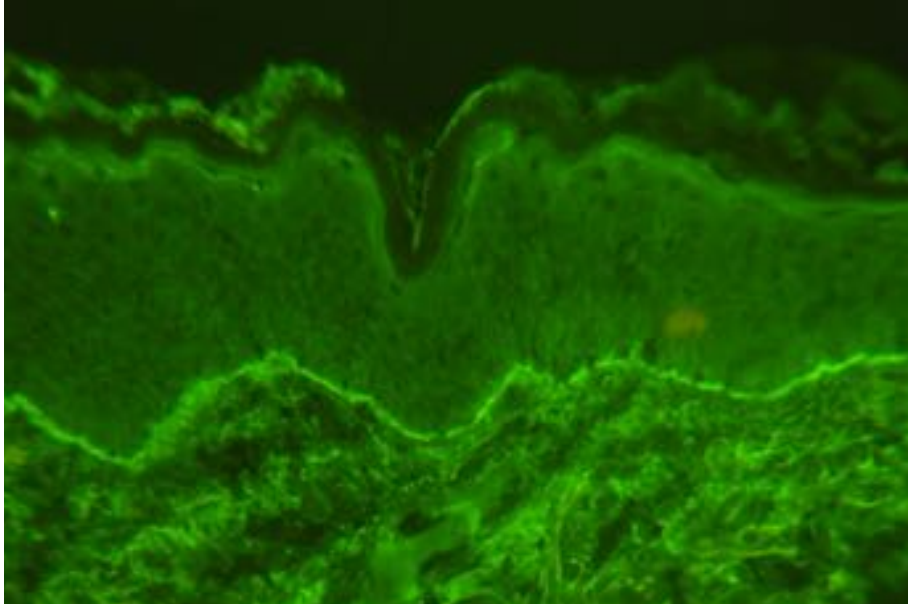
A pemphigoid gestationis olyan hólyagos bőrbetegség, mely terhesség folyamán, vagy perinatálisan jelentkezik. Az első tünet erős viszketés, melyet urtikária-szerű plakkok, majd hólyagképződés követ (ld. 12. ábra). A léziók predilekciós helyei a has, köldök, de az egész testre kiterjedhet. Szinte soha nem jár nyálkahártya érintettséggel (Sävervall és mtsai, 2017).



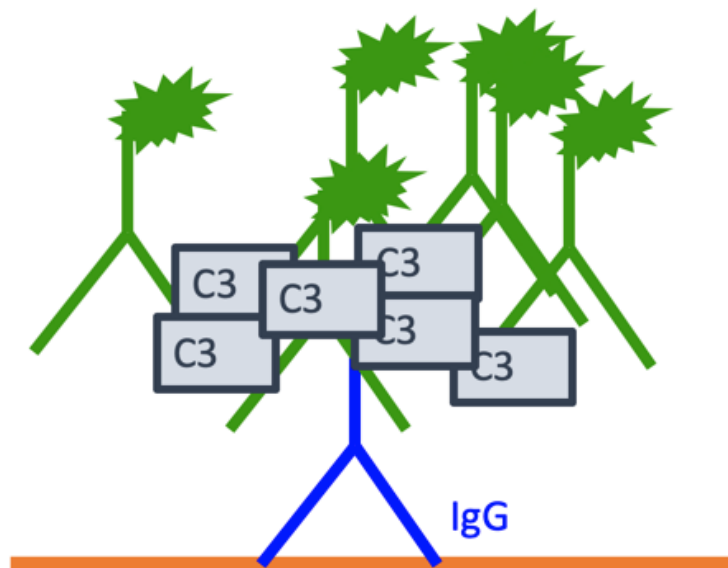
12. ábra: A PG klinikai képe. Urtikária-szerű plakkok és hólyagok a köldök területén is.

A PG pathogenezise még nem ismert minden aspektusában, de a főbb jellegzetességeit kísérletileg igazolták. Két IgG alosztály vesz részt a pathogenezisben, az IgG1 és IgG3 támadják a BP180 molekula NC16A domain-ét (Chimanovitch és mtsai, 1999). Ezen kívül a BP230 is lehet érintett. Valószínűleg a placentában ill. a fetusban található XVII-es kollagén ellen alakul ki autoimmun reakció anyai genetikai prediszpozíció esetén (Sävervall és mtsai, 2017). Megfigyelhető, hogy az apai genetika is részt vesz a pathogenezisben, mert másik apa esetén a betegség gyakran nem tér vissza.

A PG-nek nemcsak a patogenezise, hanem a diagnosztikája is nagyon hasonló a bullosus pemphigoidéhoz. DIF segítségével lineáris csapadékot figyelhetünk meg a bazálmembrán mentén C3 festéssel (ld. 13. ábra). Néha IgG festődés is látható, de nem szükséges a diagnózis felállításához. Ezt a fluoreszcenciakülönbséget felhasználva működik a komplement-fixációs teszt (CFT). A diagnosztika elvét a 14. ábra mutatja be.



13. ábra: DIF, lineáris C3 festődés, PG

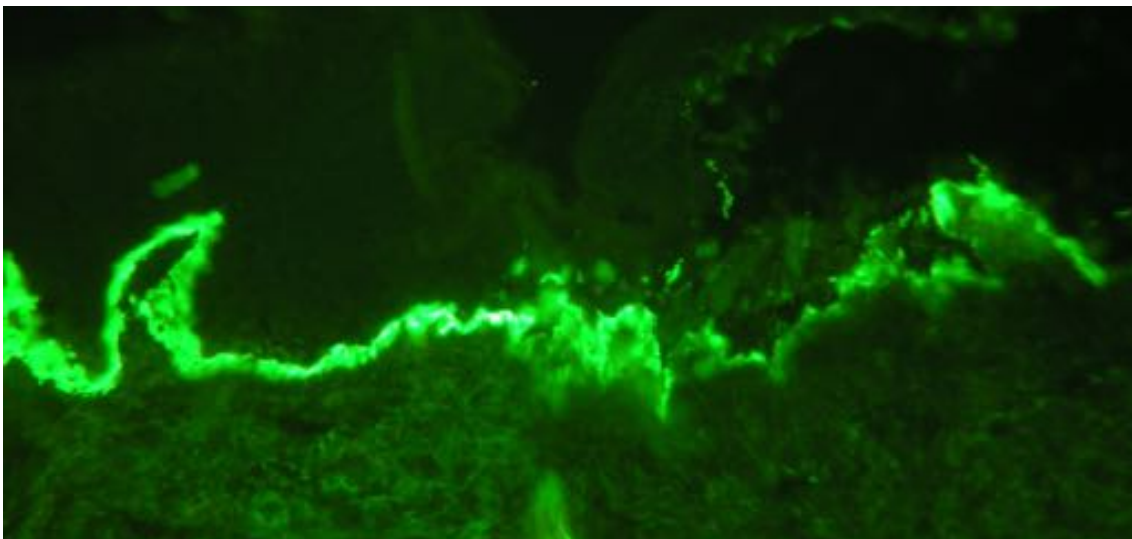


14. ábra: A komplement-fixációs teszt menete. Elsőként egészséges humán bőrt (narancssárga) inkubálunk a beteg szérumával (kék), melyhez egészséges donor komplement-gazdag plazmáját adjuk. Ezután fluoreszcein izothiocianáttal (FITC) jelölt antihumán antitestekkel kimutatjuk a C3 jelenlétét. Mivel 1 immunglobulin több C3 aktiválására is alkalmas, a fluoreszcencia felerősödik.

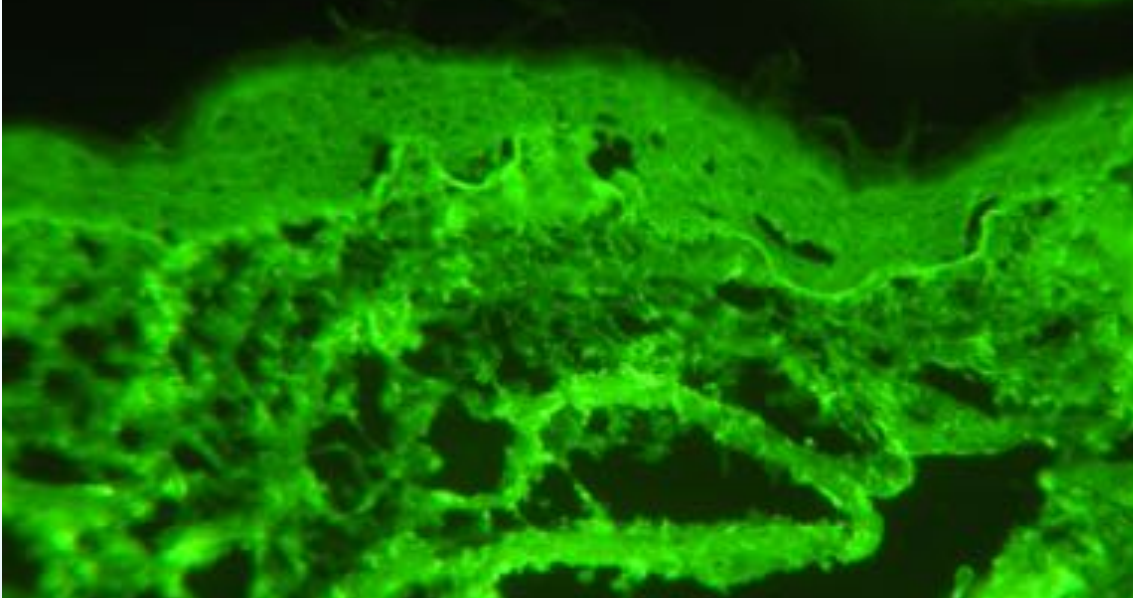
1.3 Epidermolysis bullosa acquisita

Az EBA nagyon ritka betegség, nincsenek sok beteget bemutató vizsgálatok, de az esetbemutatók és review cikkek alapján három fő variánsát különböztetjük meg (az egy-egy esetet leíró irodalmi ritkaságokat itt nem említem): a mechanobullózus, klasszikus EBA, a BP-szerű EBA és a nyálkahártya-EBA. A mechanobullózus variáns többnyire (különösen a traumának kitett helyeken) bőrfragilitás, hólyagképződés, eróziók, heggesedés és milium-képződés jellemzi. A BP-szerű forma is hasonló, viszont urtikária-szerű plakkokat is láthatunk itt. A nyálkahártya EBA pedig a nyálkahártya pemphigoidhoz hasonló nyálkahártya dominanciára utal (Koga és mtsai, 2019).

Az EBA diagnosztikája a BP-étől nem sokkal különbözik, ugyanúgy DIF, szövettan, IIF ill. ELISA szükséges hozzá. Fontos különbség, hogy az EBA autoantigénje, a VII-es kollagén, mélyebben helyezkedik el a XVII-es kollagénhez képest, így spontán hólyagképződés esetén DIF technikával a hólyag alján látható a fluoreszcencia (ahogy a 15. ábra is szemlélteti), ahogy IIF-fel sóhasított bőr esetén is, ld. 16. ábra. Ha a bőrben a col4-t festjük, a fluoreszcencia a hólyag tetején található (Hofmann és mtsai, 2019).



15. ábra: IgG4 festés, DIF: fluoreszcencia a hólyag alján.



16. ábra: Sóhasított bőr: fluoreszcencia az arteficiális hólyagok alján.

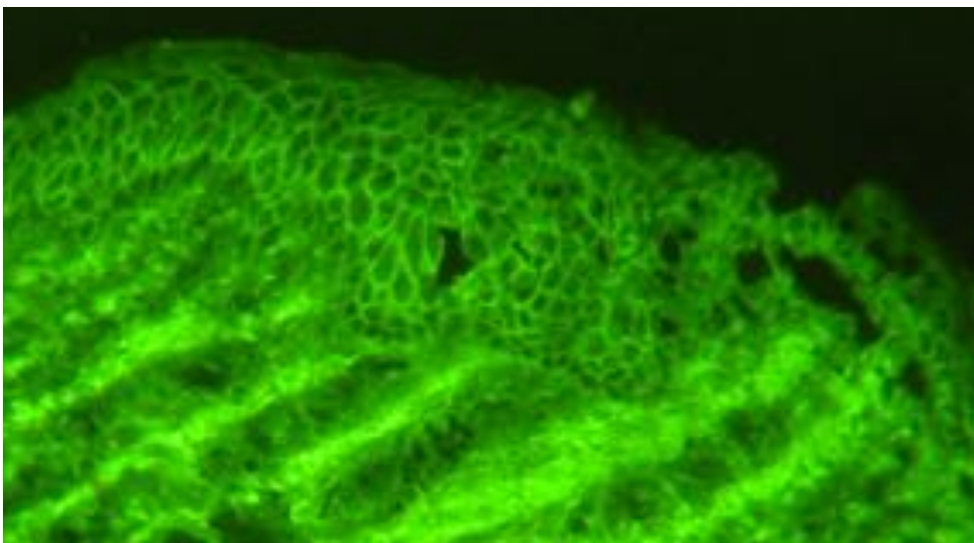
1.4 Pemphigus vulgaris (PV)

A PV három klinikai variánsa ismert: a nyálkahártya-domináns, a mukokután ill. a kután típus. Ezeknek a megkülönböztetése nem mindig egyértelmű, valószínűleg a betegség antitest-profilját jellemzik. A kután formákban desmoglein 1, a nyálkahártya-domináns formákban desmoglein 3-ellenes antitestek játszanak jelentős patogenetikai szerepet. PV esetén többnyire először a szájnálkahártyán jelennek meg hólyagok, melyek fájdalmas eróziókká alakulnak, s a betegség későbbi fázisában jelenik meg a bőrérzékenység (Kasperkiewicz és mtsai, 2017). A desmoglein 1 és 3 (dsg1 és dsg3) eloszlása különbözik a bőrön és a nyálkahártyán. A nyálkahártya valamennyi epithelsejtje erősen expresszálja a dsg3-at, viszont a basalis epithelsejtek nem expresszálnak dsg1-et. A bőrben a dsg3-expresszió a basalis rétegekben, míg a dsg1-é a subcornealis rétegben maximális, a többi rétegben expresszójuk olyan csekély, hogy nem képesek egymás kiesését kompenzálni. Ezzel magyarázható, hogy PV esetén suprabasalis résképződést és mukokután tüneteket (ld. 17. ábra), míg a csak dsg1-ellenes antitesteket mutató pemphigus foliaceus (PF) esetén pedig subcornealis hólyagképződést és kizárólag bőrérzékenységet láthatunk.

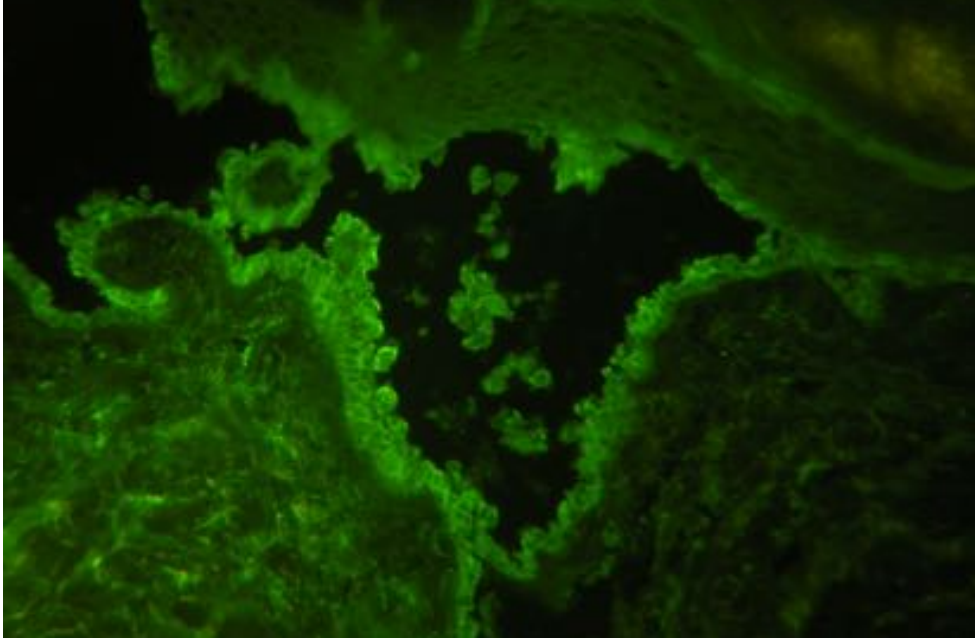


17. ábra: Vékony falú, petyhüdt, pemphigus vulgarisra jellemző hólyag

A PV diagnosztikájának legfontosabb elemei is a DIF, az IIF és az ELISA. DIF-fel intercelluláris lineáris rajzolat figyelhető meg, ami így hálózatos mintára emlékeztet. A 18. ábra szemlélteti a PV és PF klasszikus DIF képét. Ahogy a 19. ábra is mutatja, néha lehetséges további differenciálás DIF segítségével. Nemcsak a hólyagképződés magassága, hanem a festődés intenzitása is jól mutatja, hogy a kóros jelenségért felelős faktor a mélyben, azaz a suprabasalis réteg magasságában található.



18. ábra: DIF, IgG festés, hálózatos lineáris mintázattal: PV



19. ábra: C3, magas intenzitású lineáris festődés a hólyag alján, hólyagképződés a suprabasalis sejtsor magasságában.

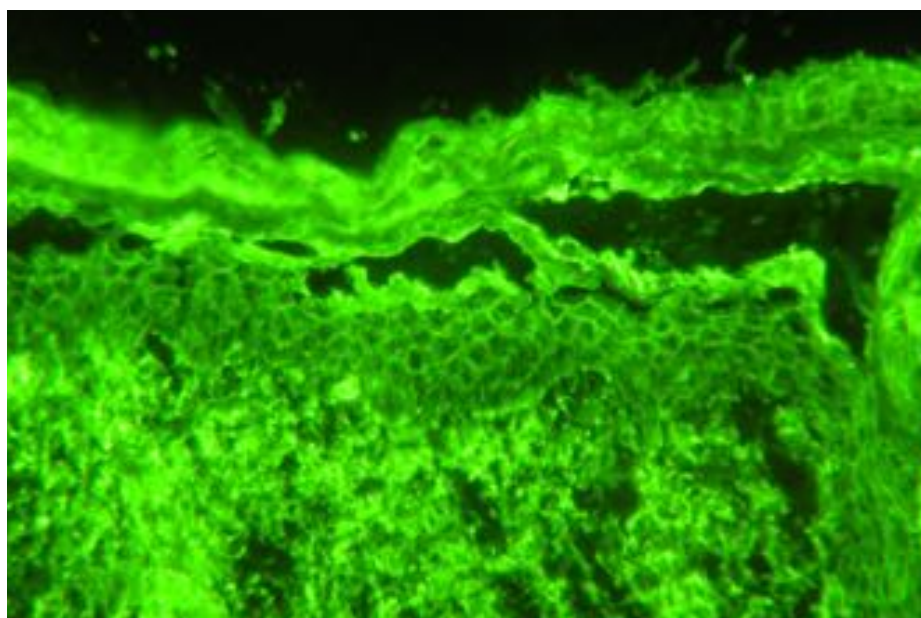
1.5 Pemphigus foliaceus (PF)

A PF antigénje, a desmoglein 1 (dsg1) az epidermis granuláris részében expresszálódik, így subcornealis hólyagképződéshez vezet. Ezek a hólyagok vékony faluk miatt rendkívül fragilisak, felszínesek, így sokszor nem is láthatók, csupán erosiók emlékeztetnek a hólyag jelenlétére (ld. 20. ábra). Két domináns altípusa van a betegségnek: az endémiás fogo selvagem, ill. az Európában szinte kizárólagosan előforduló idiopathias PF (James és mtsai, 2011). A dolgozatban PF alatt az idiopathias formát fogom érteni. A PF klinikailag általában kevésbé agresszív, mint a PV, de a szisztémás immunszuppresszió többnyire ugyanúgy elkerülhetetlen.

A PF diagnosztikája gyakorlatilag megegyezik a PV-ével. Itt is megfigyelhetünk a pemphigus vulgarisnál már észlelt intenzitáskülönbséget DIF-fel: a hólyagképződés az epidermis magasabb rétegeiben történik, ill. a festődés intenzitása a magasabb rétegekben erősebb, ahogy a 21. ábra is mutatja. Az ELISA dsg1 pozitivitást mutat, az IIF pedig intercelluláris hálózatos, lineáris festődést.



20. ábra: erythémás szélű erosiók, PF, hát

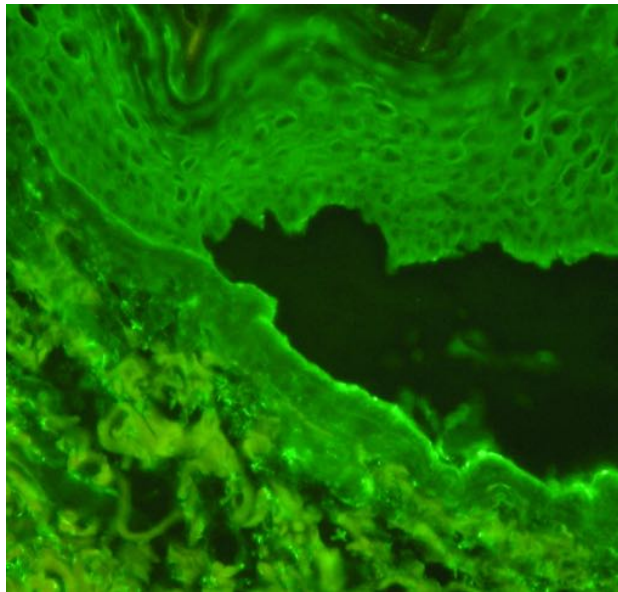


21. ábra: Lineáris intercelluláris felrakódás IgG festéssel. Az intenzitás az epidermis magasabb részeiben erősebb, ill. itt jelentkezik a hólyagképződés is.

1.6 A pemphigoid csoport egyéb tagjai

1.6.1 Anti-p200 pemphigoid

Az anti-p200 pemphigoid többnyire egy kevésbé agresszív pemphigoid-forma, de progresszív betegséget is leírtak. A diagnózis DIF, IIF és immunoblot segítségével állítható fel, ebben nem különbözik a pemphigoidtól. Az immunoblot IgG4 és/vagy IgG1 autoantitesteket mutat a 200-kDa protein (γ 1 laminin) ellen dermális kivonatban (Commin és mtsai, 2016). A 22. ábrán látható a hólyagképződés, a fluoreszcencia az sóhasított humán bőr alján figyelhető meg.



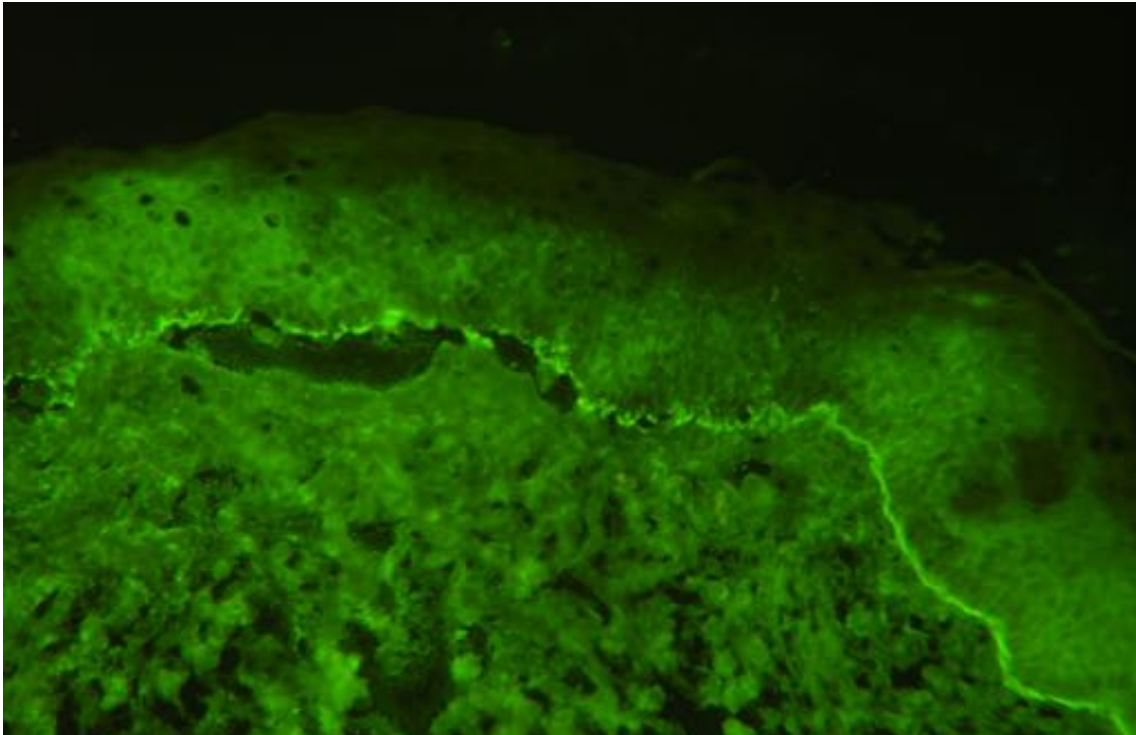
22. ábra: Lineáris fluoreszcencia IIF-ben, IgG festődéssel a mesterséges hólyag alján

1.6.2 Lineáris IgA dermatózis

A lineáris IgA dermatózis két korosztályban jelenik meg többnyire, mely eltérő klinikai képpel társul. Az első manifesztáció a 3-5 éves gyerekekre jellemző, a második először a 60-65. életévekben jelentkezik. Gyerekkorban tipikusan a törzsön, az arcon, genitálisan és a végtagokon jelentkeznek gyűrű alakzatban mintegy gyöngysorszerűen felfűzött hólyagok. Felnőtkorban főként a törzs, a gluteális régió és az arc érintett, de a betegek 80%-ában a nyálkahártya is (Juratli és mtsai, 2019).

A diagnosztika DIF-en és IIF-en alapszik, lineáris IgA felrakódást figyelhetünk meg a bazálmembrán mentén. Sóhasított bőrrel tesztelve ez a fluoreszcencia az epidermális oldalon jelenik meg. Jelenleg még nem áll rendelkezésre rutin ELISA a

diagnosztikához, viszont immunoblot segítségével erre specializált laboratóriumokban lehetséges a szerológiai diagnosztika.



23. ábra: lineáris IgA felrakódás a bazálmambrán mentén

1.6.3 Brunsting-Perry pemphigoid, dyshidrosiform pemphigoid és egyéb ritkaságok

A Brunsting-Perry ill. a dyshidrosiform pemphigoid lokalizált pemphigoid-formák, melyeknek diagnosztikájára ebben a dolgozatban nem térek ki részletesebben. A Brunsting-Perry pemphigoid a fejet érinti, a dyshidrosiform pedig a kezeket és lábakat.

Pemphigoid esetén előfordulhat, hogy az IgA és az IgG ugyanolyan intenzitással megjelenik egy betegben, avagy IgG detektálható ELISA-val IgA-pozitív betegben: ez a lineáris IgA/IgG dermatózis. Ezen felül létezik még laminin $\gamma 1$ =anti-p200 pemphigoid, laminin 332 pemphigoid, $\alpha 6/\beta 4$ integrin pemphigoid, Col4 pemphigoid, IgA EBA, lichen planus pemphigoides és a pemphigoid vegetans.

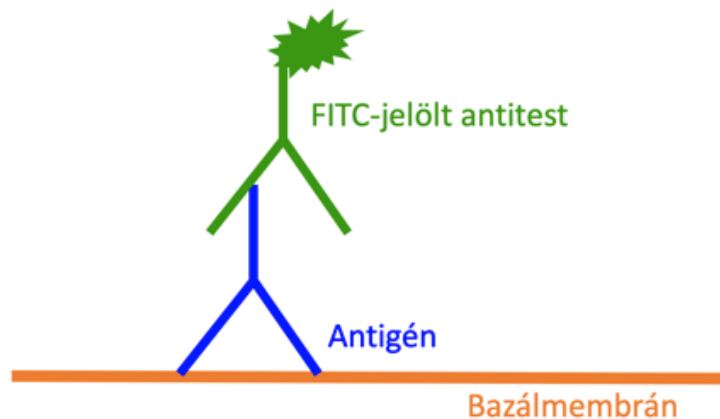
2. Autoimmunbullózisok diagnosztikájában használt vizsgálómódszerek

2.1 Direkt immunofluoreszcencia

A direkt immunofluoreszcencia a bullózus bőrbetegségek diagnosztikájának legfontosabb eszköze. A diagnózis egyes esetekben megfelelő klinikai kép és

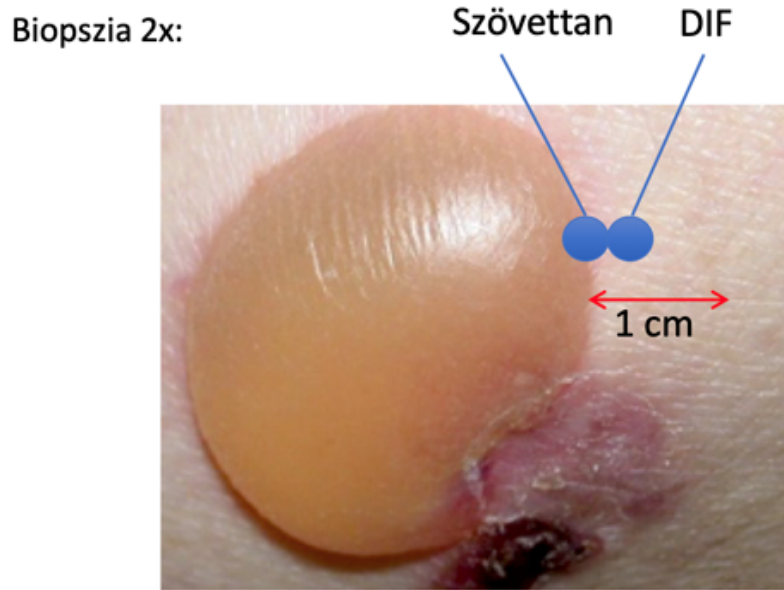
hólyagképződés, ill. tipikus mintázat megjelenése esetén akár pozitív szerológia hiányában is felállítható segítségével. A konkrét antigénről nem ad információt, de a lehetőségeket leszűkíti a kötődési mintázat alapján (Witte és mtsai, 2018).

A DIF azon az elven alapszik, hogy a szövethez kötött antigéneket (ami lehet önmaga egy antitest) olyan antitesttel inubáljuk, melyhez fluoreszceint kapcsoltunk korábban. A módszer a 24. ábrán került ábrázolásra.



24. ábra: A bazálmembrán, avagy egyéb struktúra ellenes antitestek (antigén) kimutatása fluoreszcein isothiocianát (FITC) segítségével.

A mintavétel egy hólyag mellett, perilezionálisan történik, max. 1 cm-re a hólyag szélétől. Ekcéma-szerű pemphigoid esetén a biopsziát vehetjük az erythemás részből is. Mivel a bazálmembrán ill. az epidermis kerül vizsgálatra, fontos, hogy a dermoepidermális junkció és az epidermis intakt legyen. A mintát fiziológiás sóoldatban (max. 1 nap) vagy Michels médiumban (max. 1 hét) szállíthatjuk a laborba, ahol vagy azonnal fel kell dolgozni, vagy fagyasztva tárolni. A mintavétel helyét a 25. ábra szemlélteti.



25. ábra: Bullózus betegségek esetén a szövettani mintát a hólyag és az egészséges bőr határáról, a DIF biopsziát egészségesnek tűnő bőrből kell venni.

A pemphigoidcsoport esetén lineáris fluoreszcenciát keresünk, ami megszakítás nélkül jelen van a bazálmembrán teljes hosszában, többnyire IgG, néha IgA festéssel. C3 festéssel is többnyire lineáris fluoreszcenciát láthatunk, de a granuláris mintázat is megerősítheti a diagnózist. Lehetőségünk van IgG₁₋₄ alosztály vizsgálatára is, de a laboratóriumi nehézségek miatt, és mivel nincs terápiás konzekvencája, ezt ritkán alkalmazzuk.

Ugyan mindkét betegség esetén lineáris fluoreszcenciát figyelhetünk meg a DIF-ben, a BP és az EBA megkülönböztethető a fluoreszcencia mintázata alapján is: az n-alakú íveket leíró minta a pemphigoidra jellemző, az u-szerű pedig tipikus VII-es típusú kollagén (col17) érintettség, azaz EBA esetén. A különböző fluoreszcencia különböző diagnózishoz vezet. A leggyakoribbakat a 26. ábrán ábrázoltam.

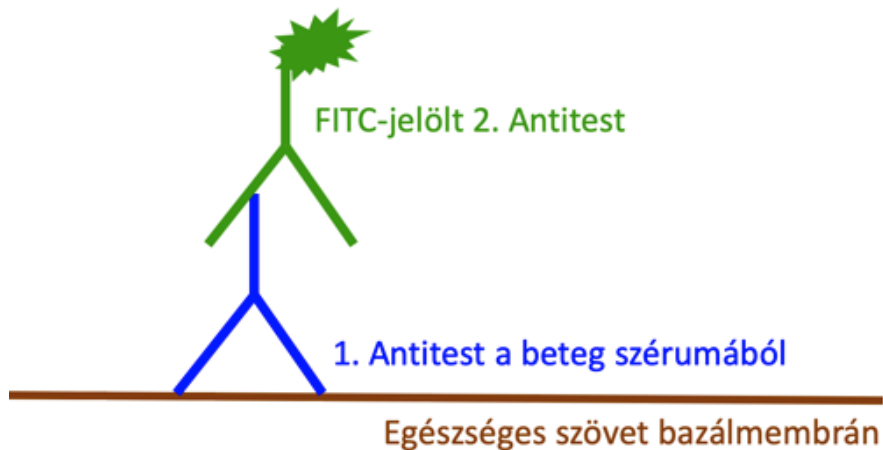
		Hólyag	Mintázat
IgA	lineáris IgA dermatózis	felül	n
	IgA EBA	alul	u
IgG/C3	lineáris IgA/IgG dermatózis	felül	n
	BP	felül	n
	EBA	alul	u

26. ábra. Lineáris fluoreszcencia mintázatok direkt immunofluoreszcencia esetén. Amennyiben jelen van hólyag is a metszeten, ez a hólyag tetején vagy alján futhat, ill. n, vagy u-szerű ívű mintázat is megfigyelhető lehet.

Mivel a laboratóriumunkban használatos standard diagnosztikával végeztük a kutatásokat, a DIF technikájának részletes leírása a módszerek fejezetben olvasható.

2.2 Indirekt immunfluoreszcencia

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. A mintázat megegyezik a korábban a DIF-nél ismertettekkel. A technika abban különbözik, hogy nem a beteg bőrét, hanem a szérumát vizsgáljuk egy idegen szövet segítségével. Ez lehet majom, nyúl, tengerimalac és humán nyelvcső (pemphigus és pemphigoid), patkány és majom hólyag (paraneoplastikus pemphigoid), vagy amnion epithel (BP és PV) (Witte és mtsai, 2018). A technika lényegét a 27. ábra szemlélteti:



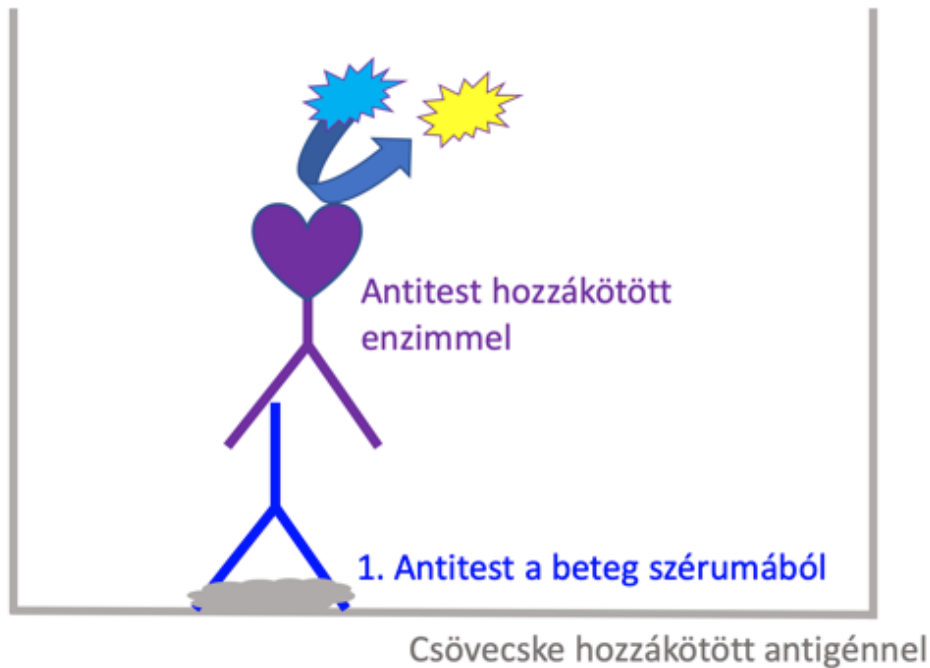
27. ábra: A szövetet először a beteg szérumával inkubáljuk, majd mosás után a kötődött antitestet FITC jelölt antitesttel mutatjuk ki.

A technika humán bőrrel is alkalmazható, a gyakorlatban humán bőrt viszont csak sóhasított bőrként használunk erre a célra, mely közelebb visz minket a helyes diagnózis felállításához a felrakódás helyének kimutatásával (De és mtsai, 2010). 1 mol/l koncentrációjú, hipertóniás NaCl oldatos inkubáció után a bőr a col4 „magasságában” elválk egymástól, így a hólyag alján megjelenő fluoreszcencia azt mutatja, hogy ennél mélyebben helyezkedik el az antigén (pl. p200, col7), amennyiben a hólyag tetején van, ennél magasabban (pl. BP180, BP230).

Mivel standard diagnosztikával végeztül a vizsgálatokat, ezen technika részletes leírása is a módszerek fejezetben olvasható.

2.3 ELISA

Az enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) az autoimmunbullózisok diagnosztikájának szenzitív és specifikus eszköze (Sárdy és mtsai, 2013). 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, a technika viszont nem különbözik. Az ELISA mechanizmusát az 28. ábra szemlélteti.



28. ábra: Az antigént a gyártó a csövecske aljához köti. Ehhez adjuk hígítás után a beteg szérumát, majd inkubáció után lemoszuk a nem kötődött antitesteket. Ezután inkubáljuk az antitesthez kötött enzimmel, majd mosás után a szubsztráttal. A színváltozás jelzi a reakciót, mely nemcsak szemmel látható, hanem mérhető is.

Mivel a csöveket egységesen készítik el, s a színváltozást mérjük, a technika kvantitatív, így kiválóan alkalmazható a betegek utánkövetésére.

2.4 Szövettan

A klasszikus szövettan a bullózus betegségek differenciáldiagnosztikájára alkalmas, azaz más, nem autoimmun eredetű kórképektől való elkülönítésre, ill. a betegcsoport meghatározására. Önmagában szövettan alapján nem tudunk pontos diagnózist felállítani, viszont a pathogenezisben szerepet játszó sejtek leírása csak szövettanal lehetséges, melynek szerepe lehet a későbbi terápiás lehetőségek kiválasztásában.

2.5 Immunoblot

Az immunoblot drága és megfelelő laboratóriumot igénylő technika, így csak kevés helyen áll rendelkezésre. Abban az esetben szoktuk alkalmazni, ha a többi diagnosztikus módszerrel nem lehetséges specifikus antigént identifikálni, illetve, ha nem konkluzívak az eredmények. Nyálkahártya-pemphigoidban gyakrabban van rá szükség, de nem kizárólag ekkor használjuk. Kimutatható vele az anti-p200 antitest, antitestek a BP180 C-terminálisa, ill. a szolubilis, a LAD-1 antigén ellen, valamint találhatunk envoplakin, periplakin, desmoplakin, BP180, BP230, $\alpha 4\beta 6$ -integrin, laminin 332, Col4 ellenes antitesteket is (Witte és mtsai, 2018).

II. Célkitűzések

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 kiteknél? Milyen előnyökkel, hátrányokkal jár a klinikai alkalmazása?
2. Lehet-e a CFT tesztet használni bullosus pemphigoid diagnosztikájában? Javulnak-e tőle az eredmények, lehet-e tisztázatlan eseteket diagnosztizálni a segítségével?
3. Amennyiben az IIF majom nyelvcsövön álnegatív, lehet-e IgG alosztályokat kimutatni a beteg szérumból? Növelhető-e így az IIF 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 (ASPT) segítségével. 120 beteg szérumát választottuk ki, akiknél bullózus autoimmun betegség diagnózisát állítottuk fel 2008. november 1. és 2014. április 31-e között a Ludwig Maximilian Egyetemen, Münchenben. Ezen felül további 17 EBA szérummintát vettünk be a vizsgálatba a Lübecki Egyetemről, valamint egyet a Philipps Egyetemről, Marburgból. 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 (DIF), IIF (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: 6 U/mL a col7 ELISA esetén, 9 U/mL a BP180 és BP230 esetén, dsG1 esetén 14 és 20 U/mL között, desmoglein 3 esetén 7 és 20 U/mL között szürke zóna definiált. A szürkezónás eseteket negatívnak tekintettük ebben a vizsgálatban, tehát értelemszerűen a 20 U/mL feletti értékeket vettük pozitívnak. Minden szérum, mely álopozitív eredményt mutatott, két vagy három alkalommal lett tesztelve. A DIF és IIF mikroszkópia standard laboratóriumi eljárással lett kivitelezve (Sárdy és mtsai, 2013).

DIF elvégzésére az esetek 54%-ában került sor, IIF mikroszkópia és specifikus ELISA pedig minden esetben. Így vizsgálatunkban egyszerűen össze tudtuk hasonlítani az új ELISA értékeket a már meglévőkkel, ezeket fogom ebben a dolgozatban korábbi ELISAként emlegetni.

A három specifikus diagnosztikai vizsgálat, a DIF, az IIF valamint az ELISA mind 90% fölötti specificitással rendelkeznek, így, amennyiben egy minta két vizsgálatban is pozitív volt, több mint 99% pozitív prediktív értékkel jellemezhető. Ez esetünkben azt jelenti, hogy legfeljebb 0-2 esetben fordulhatna elő téves a diagnózis a 138 betegből, ami nem módosíthatja az eredményeinket szignifikánsan.

Az ASPT-t is a gyártó (MBL) instrukcióinak megfelelően használtuk. 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 kellett válogatnunk, 52-t használtunk fel ebben a vizsgálatban, s ezeknek a szérumoknak a szenzitivitás és specificitás eredményei megközelítőleg megegyeznek a 313 vizsgált minta korábbi értékeivel (Sárdy és mtsai, 2013), 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

2.1 Betegek, szérumok

Monocentrikus, retrospektív, szerológiai eset-kontroll klinikai vizsgálatot végeztünk 300 BP-s és 136 kontroll beteg bevonásával. A szérummintákat 2008 novembere és 2014 decembere között gyűjtöttük a Ludwig Maximilian Egyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján, Münchenben. Csak olyan szérumokat használtunk fel, melyet az első diagnózis felállításának idején, az immunszuppresszív kezelés megkezdése előtt vettünk le. Ez a típusú retrospektív, nem-intervenciós laboratóriumi vizsgálat nem igényli az etikai bizottság engedélyét.

A diagnózis minden esetben a klinikai képen alapult, kiegészítve további vizsgálatokkal, melyekből legalább 2 pozitív volt: hisztológia, DIF, IIF, BP180 vagy BP230 ELISA (részleteket ld. Sárdy és mtsai, 2003). Az IIF-et pozitívként diagnosztizáltuk, amennyiben vagy majom, vagy nyúl nyelőcső, vagy humán sóhasított bőrrel vizsgálva pozitív volt. A tradicionális szövettan, DIF, IIF, BP180 és BP230 ELISA (MBL®) a laboratóriumunkban használatos standard eljárásokkal került kivitelezésre (Sárdy és mtsai, 2003).

2.2 A komplement fixációs teszt menete

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 (1 mM 5,5-dietilbarbitálsav, 2,4 mM nátrium 5,5-dietilbarbiturát, 0,3 mM CaCl₂, 1,7 mM MgCl₂, 146 mM NaCl; pH 7,2±0,2) 30 percen át. Mosás után fluoreszcein isothiocianáttal (FITC) jelölt (Dako Dánia, #F0201) 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 glicerinen mikroszkópos vizsgálatra. Pozitivitásként definiáltuk a lineáris C₃ lerakódást a sóhasított bőr bazálmembránja mentén.

3. A majom nyelőcső IIF vizsgálata

3.1 Betegek

64 BP-s beteg (31 férfi, 33 nő; átlagéletkor 75,8 év (27,2–93,7)) és 43 kontroll (10 férfi, 33 nő, átlagéletkor 52,8 év (22,0-90,0)) szérumának retrospektív analízisét végeztük el. A BP diagnosztikáját a korábban leírtaknak megfelelően végeztük el. Hogy a szerológiai alnegatív eseteket vizsgáljuk, minden BP-s szérum negatív volt majom és nyúl nyelőcső IIF-fel vizsgálva.

Minden kontroll és BP-s szérum 2008. novembere és 2015. júniusa között került levételre, az immunszuppresszív terápia bevezetése előtt. A kontroll betegeknek különböző egyéb bullózus és gyulladásszerű autoimmun betegségei voltak, s a BP minden esetben egyértelműen kizárható volt.

3.2 Indirekt immunfluoreszcencia

A következőkben a laborunkban használatos standard indirekt immunfluoreszcenciát mutatom be röviden. A beteg szérumát először 1:20-hoz hígítjuk, majd nyúl és majomnyelőcsővön inkubáljuk. Ezt követően fluoreszcein isothiocianáttal

jelölt anti-humán IgG-vel inkubáljuk (katalógusszám: 504032; Inova Diagnostics, San Diego, CA USA, vagy F1641; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, felhígítva PBS-ben 1:50 ill. 1:80 arányban).

3.3 Direkt immunfluoreszcencia

Laborunkban használatos standard: 10 µm vastagságú fagyasztott metszetet készítünk, majd 30 percig szárítjuk. Ezt követően PBS-ben 1:50-hez hígított FITC-jelölt anti-humán IgG-vel inkubáljuk (katalógusszám: 504032; Inova Diagnostics, San Diego, CA USA).

3.4 Indirekt immunfluoreszcencia IgG altípus antitestekkel

A nonspecifikus kötődések elkerülése végett egy humán isoagglutinint neutralizáló anyagot (Neutr-AB II; 213424; Medion Grifols Diagnostics, Svájc) 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 (beleértve egy pozitív és két negatív belső kontroll minden teszt előtt) 1:10-hez lett hígítva PBS-ben (végső hígítás tehát 1:20), majd ezt inkubáltuk nem fixált, fagyasztva metszett nyúl és majom nyelőcsövön 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 (sc-45051, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Ismételt mosás után hozzáadtuk a szekunder antitestet, egy monoklonális, anti-humán, FITC-jelölt IgG1-, IgG3- vagy IgG4-ellenes egér antitestet (F0767, F4641 és F9890, Sigma-Aldrich). 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 gliceriben mikroszkópos vizsgálatra.

Akkor definiáltuk a metszetet pozitívnak, ha az adott IgG altípus a nyelőcső bazálmembránjának legalább egyharmadán lineáris fluoreszcenciát mutatott az epithelialis és a mucosalis papillán is. Két független vizsgáló nézte meg a metszeteket (JJ és SM), akik nem tudták, melyik metszet milyen szérummal volt kezelve (vak próba).

Határeseti metszeteknél, ill. amennyiben a két vizsgáló véleménye különbözött, egy ill. két alkalommal megismételtük a kísérletet a szérumokkal. Amennyiben ezután sem sikerült konszenzusra jutni (az esetek kevesebb, mint 10%-a volt ilyen), a végső elbírálás minden esetben SM által történt, hogy a megfigyelők közötti különbségből adódó pontatlanságokat elkerüljük.

3.5 ELISA

A BP180 és BP230 ELISA vizsgálatokat a gyártó utasításainak megfelelően végeztük (Medical & Biological Laboratories Co, Ltd, Nagoya, Japan).

4. Mirigykivezetőcsövek vizsgálata direkt immunfluoreszcencia segítségével

4.1 Betegek

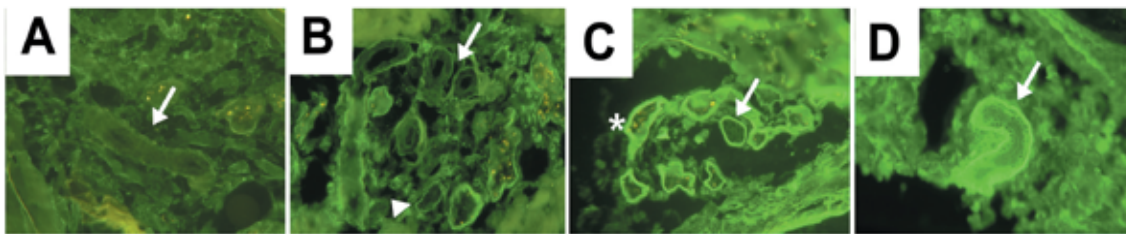
Monocentrikus eset-kontroll vizsgálatot végeztünk 64 BPs és 82 kontroll beteggel a Ludwig-Maximilian Egyetemen, Münchenben. Egy ilyen nem-intervenciós vizsgálat, melyet a rutin diagnosztika részeként végeztünk, nem igényli etikai bizottság engedélyét Németországban.

Ötvenegy 2015-ben diagnosztizált beteg archivált szövetmintáját használtuk fel, melyeket fagyasztva metszettünk és újrafestettünk, valamint felhasználtunk 13 további beteg mintáit, akik a vizsgálat ideje alatt kaptak diagnózist (2016. január-április). 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 (VMK) jelenléte a metszeten, továbbá egyértelmű BP diagnózis. A kontroll DIF-ek olyan 82 betegből kerültek ki, akiket 2016-ban diagnosztizáltunk egyéb bőrbetegséggel, s a BP-t egyértelműen kizártuk. Olyan betegeket, akiknek nem volt egyértelmű a diagnózisa vagy nem volt mirigykivezetőcsöve a metszeten, kizártunk a vizsgálatból.

4.2 Direkt immunfluoreszcencia vizsgálat

Az in vivo kötődött IgG antitesteket DIF 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 (katalógusszám: #F1641; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 30 percig szobahőmérsékleten, sötét, szobahőmérsékletű kamrában. A metszeteket nem blokkoltuk. A metszetek vizsgálatát ISB és MS végezték a fluoreszcencia mintája és intenzitása alapján. A VMK helyzete külön fel lett jegyezve a papilláris, a papilláris alatti (középső), és a mély dermisben. Az intenzitást szemikvantitatív módon egy 0-4-ig terjedő skálán jelöltük (0, nincs fluoreszcencia; 4, legerősebb fluoreszcencia). A különböző intenzitásokra a példát a 29. ábra mutatja.



29. ábra. A VMK semikvantitatív vizsgálata. (A) Nincs fluoreszcencia (0 intenzitás, fehér nyíl). (B) Halvány lineáris felrakódás (nyíl, 1-es intenzitás) és kisebb nyíl: 2-es intenzitás. (C) 3-as intenzitás (nyíl) verejékmirigy mellett (csillag). (D) 4-es intenzitású fluoreszcencia (fehér nyíl).

Egyes, random kiválasztott metszeteket anti-BP180 és anti-BP230 monoklonális antitestekkel jelöltünk (HD18 (Pohla-Gubo és mtsai, 1995) ill. Cosmo Bio, CAC-NU-01-BP1) hogy a BP180 és BP230 jelenlétét demonstráljuk az adnexális bazálmembránban. A monoklonális antitesteket 1:1 ill. 1:10 arányban hígítottuk PBS-ben, majd 60 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Mosás után FITC-cel jelölt poliklonális egér-ellenes IgG antitesteket adtunk hozzá (#sc-3699 Santa Cruz Biotechnology), majd az eredményt mikroszkóppal vizsgáltuk.

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 titerét 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.

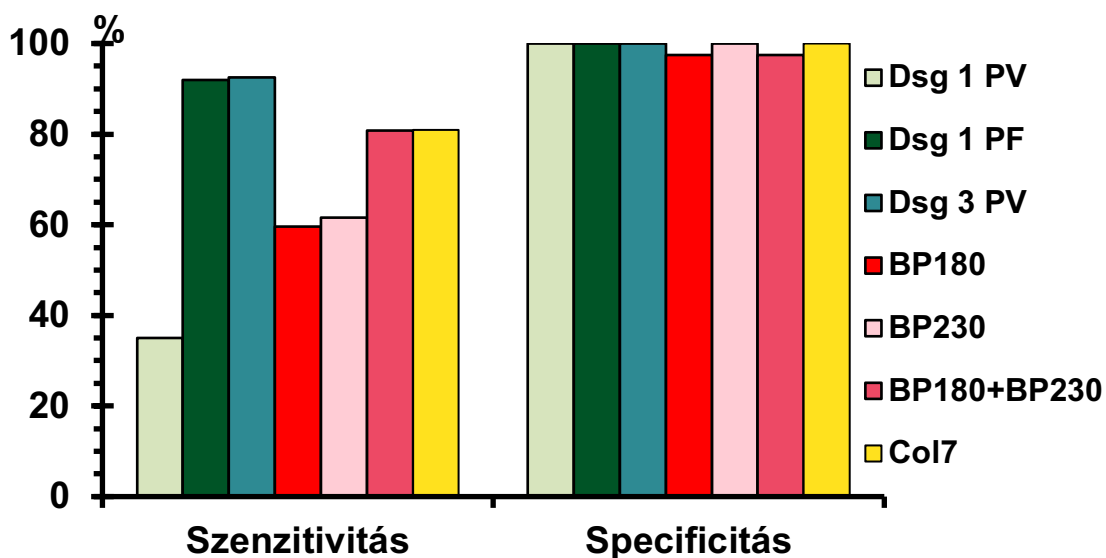
A statisztikához használt szoftver: GraphPad Prism version 4.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, továbbá számolásokat végeztünk a GraphPad honlapján (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). A „receiver operating characteristic” (ROC) analízishez az SPSS 21.0-ás verziót, SPSS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

IV. Eredmények

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

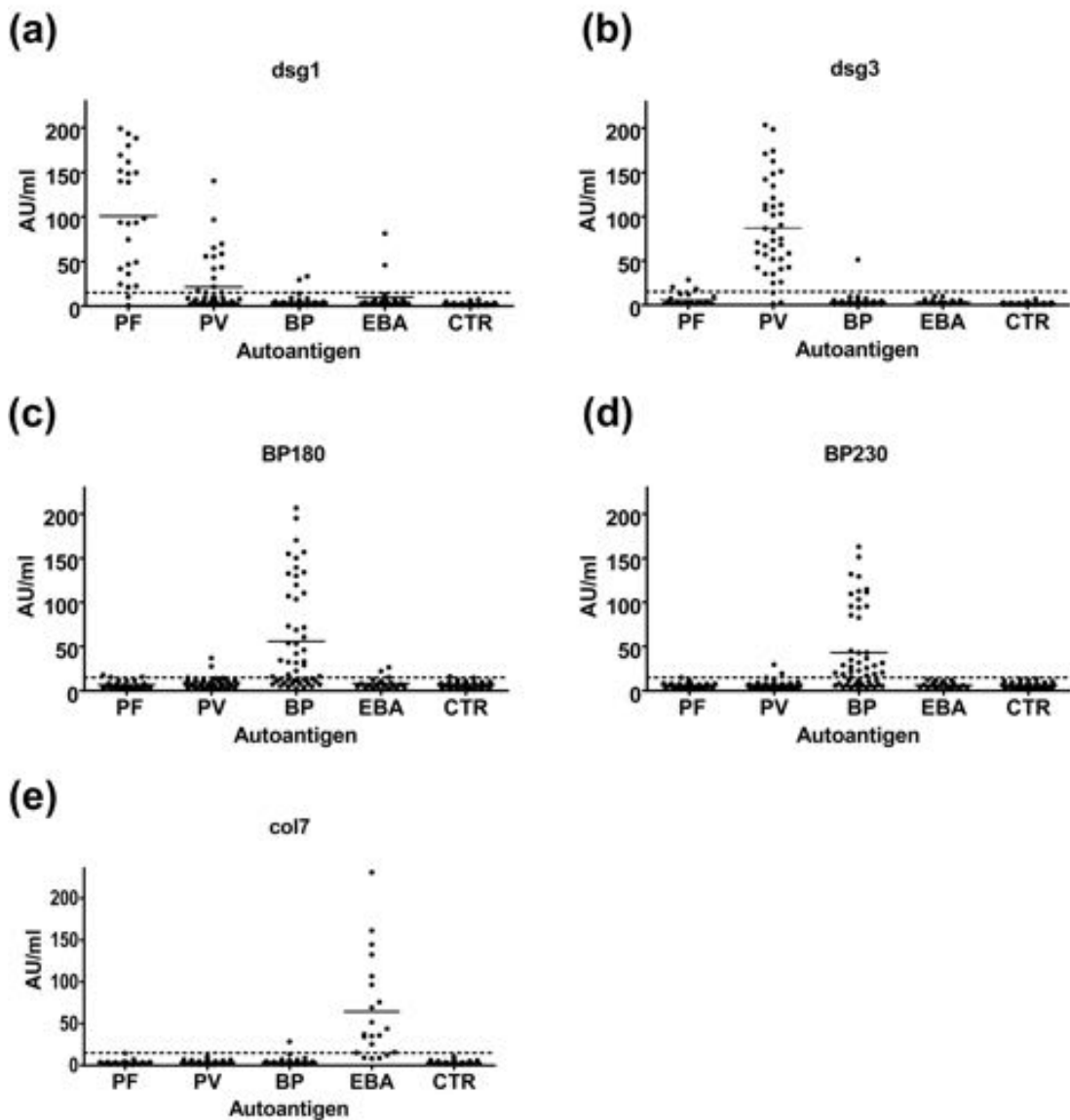
Az ASPT szignifikánsan gyorsabban végezhető el, mint korábbi ELISA-k, mivel az inkubációs idő csak 50%-a a specifikus MBL kiteknek, és mind az öt teszt elvégezhető egyidejűleg. Összességében a szérum csőbe pipettázásától az eredmények kinyomtatásáig kb. 1,8 óra telik el. Az ASPT elvégezhető akár csak 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 ASPT eredményei a laborunkban korábban elvégzett specifikus kitek eredményeivel 88,2% konkordanciát mutattak. A szenzitivitás és specificitás értékeket az 30. ábra illusztrálja. Az autoantitest-titerek a PF, PV, BP, EBA betegek szérumában és a kontroll betegekében a 31. ábrán vannak szemléltetve. 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 ($P=0,49, 0,62, 1,0, 0,32, \text{és } 0,34$).



	Szenzitivitás %	Specificitás %
Dsg1 PV	35	100
Dsg1 PF	92	100
Dsg3 PV	92,5	100
BP180	59,62	97,5
BP230	61,54	100
BP180+BP230	80,77	97,5
Col7	80,95	100

30. ábra. A "MESACUP anti-Skin profile TEST" szenzitivitás és specificitás értékei diagrammon ill. a pontos értékek felsorolása táblázatos formában. BP, bullous pemphigoid; Col7, type VII collagen; dsg1, desmoglein 1; dsg3, desmoglein 3; EBA, epidermolysis bullosa acquisita; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris.



31. ábra. Pont diagramon ábrázolva: dsg1, dsg3, BP180, BP230 és col7 autoantitest értékek PF, PV, BP, EBA és control szérum esetén. A gyártó által javasolt cut-off értékeket szaggatott vonal jelzi (15 AU/ml minden ASPT teszt esetén). CTR, control szérum. További rövidítéseket ld. 30. Ábra

100% volt a specificitása a dsg1-nek PF esetén, dsg3-nak PV esetén, BP230-nak BP-ben, és a col7-nak EBA-s betegek szérumában. A BP180 specificitása 97,5% volt bullosus pemphigoid esetén. Két PF szérum álopozitív eredményt mutatott az ASPT-ben a BP180 vizsgálatban, de ezek nem voltak reprodukálhatóak egy ismételt ASPT teszttel ill. a specifikus BP180 ELISA-val sem. 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, ahogy a szakirodalomban is olvasható (1-5. táblázat).

1. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékek a szakirodalomban desmoglein 1 ELISA tekintetében pemphigus foliaceusban vizsgálva

Szerző	n	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Gyártó
Amagai és mtsai, 1999 ⁰	48	97,9	98,9	MBL
Huang és mtsai, 2007	9	100	97,4	MBL
Schmidt és mtsai, 2010	50	96	99,1	házi készítés
Schmidt és mtsai, 2010	50	100	95,7	MBL
Ishii és mtsai, 1997	49	96	96	házi készítés

2. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékek a szakirodalomban desmoglein 3 ELISA tekintetében pemphigus vulgarisban vizsgálva

Szerző, év	n	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Gyártó
Amagai és mtsai, 1999 ⁰	81	97,5	97,8	MBL
Daneshpazhooh és mtsai, 2007	73	94,5	-	MBL
Hallaji és mtsai, 2006 ^{Error! Reference source not found.}	50	94	-	MBL
Huang és mtsai, 2007	20	85,0	99,1	MBL
Ishii és mtsai, 1997	46	94	96	házi készítés
Schmidt és mtsai, 2010	71	100,0	99,6	házi készítés
Schmidt és mtsai, 2010	71	100,0	95,7	MBL
Sharma és mtsai, 2006	27	85,2	100,0	MBL

3. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékek a szakirodalomban, BP180 ELISA

Szerző	n	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Gyártó
Barnadas és mtsai, 2008	24	92,0	96,0	MBL
Charneux és mtsai, 2011	138	86,0	-	MBL
Kobayashi és mtsai, 2012	64	84,4	98,9	házi készítés
Damoiseaux és mtsai, 2012	60	80,0	98,0	MBL
Damoiseaux és mtsai, 2012	60	86,7	93,0	EUROIMMUN
Hofmann és mtsai, 2002	116	93,1	98,0	házi készítés
Mariotti és mtsai, 2004	78	82,0	100,0	házi készítés
Roussel és mtsai, 2011	190	79,0	90,0	MBL
Sakuma-Oyama és mtsai, 2004	102	89,0	98,0	MBL
Sárdy és mtsai, 2013 ^{Error! Reference source not found.}	313	72,0	94,1	MBL
Sitaru és mtsai, 2007	118	89,8	97,8	EUROIMMUN
Sitaru és mtsai, 2007	118	89,0	94,8	MBL
Tampoia és mtsai, 2009	20	90,0	98,8	MBL
Thoma-Uszynski és mtsai, 2004	127	95,3	94,0	házi készítés
Yoshida és mtsai, 2006	239	69,9	98,8	MBL
Zillikens és mtsai, 1997	50	94,0	99,9	házi készítés

4. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékek a szakirodalomban, BP230 ELISA

Szerző	n	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Gyártó
Blöcker és mtsai, 2012	118	56,8	97,6	EUROIMMUN
Charneux és mtsai, 2011	138	59,0	-	MBL

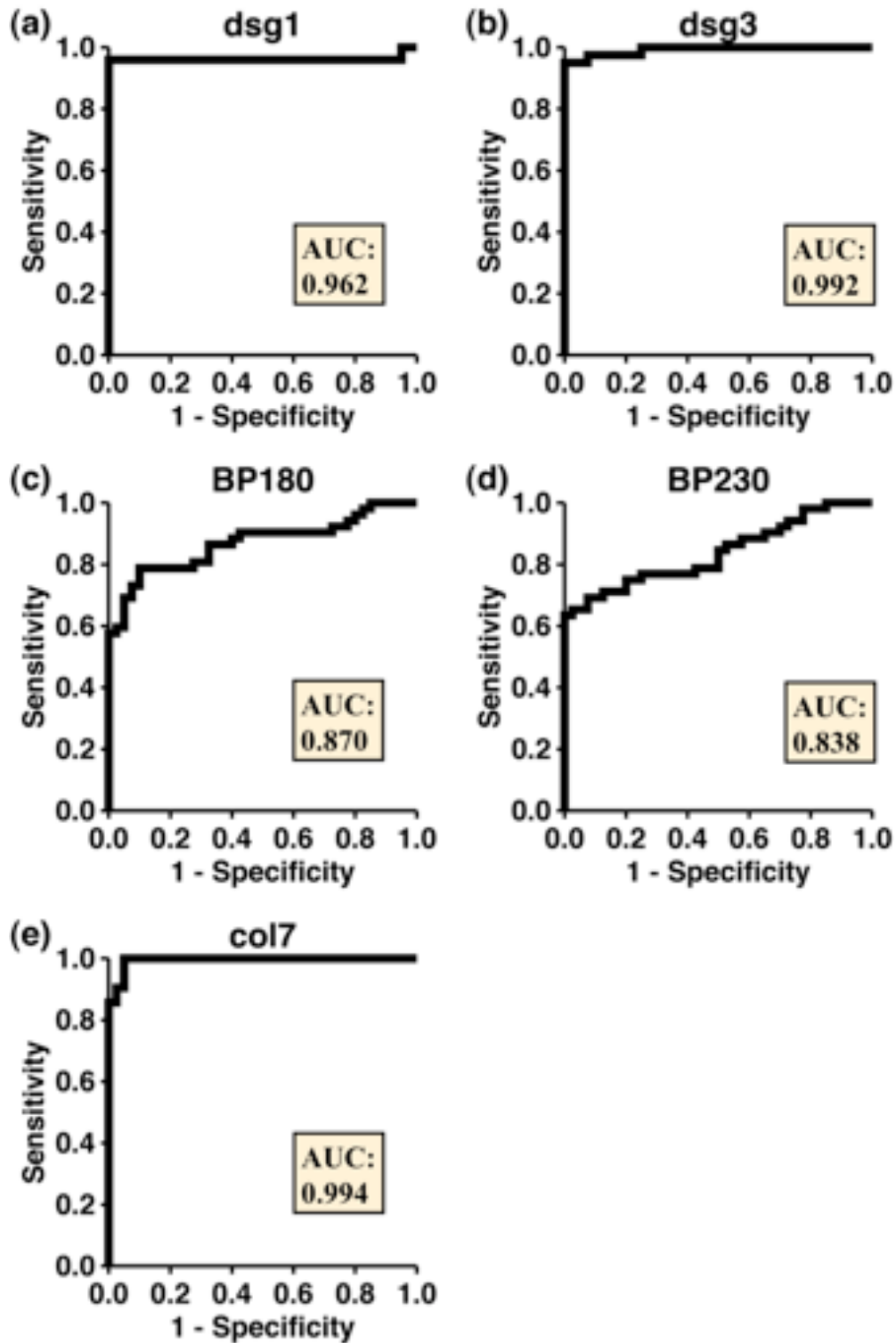
Damoiseaux és mtsai, 2012	60	58,3	93,0	MBL
Damoiseaux és mtsai, 2012	60	60,0	82,5	EUROIMMUN
Roussel és mtsai, 2011	190	61,0	96,0	MBL
Sárdy és mtsai, 2013	313	59,0	99,2	MBL
Tampoia és mtsai, 2009	20	60,0	98,8	MBL
Thoma-Uszynski és mtsai, 2004	127	81,5	64,8	házi készítés
Yoshida és mtsai, 2006	239	72,4	99,5	házi készítés

5. táblázat. Szenzitivitás és specificitás értékek a szakirodalomban, col7 ELISA

Szerző	n	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Gyártó
Chen és mtsai, 1997	24	100	100	házi készítés
Kim és mtsai, 2013	30	96,7	98,1	MBL
Komorowski és mtsai, 2013	73	94,5	98,7	házi készítés
Marzano és mtsai, 2013	14	86	98,6	MBL
Saleh és mtsai, 2011	49	93,8	98,1	MBL
Terra és mtsai, 2013	28	54	97,8	MBL

Az ASP 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 col7-re 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. Az adatok a 32. ábrán tekinthetőek meg. A dsg1 szenzitivitása PF esetén megnövelhető 92%-ról 96%-ra a cut-off csökkentésével 15-ről to 8,8 U/ml-ra, ami a specificitást nem befolyásolja, továbbra is 100% marad. A görbe alatti terület, "area under the curve" (AUC) 0,962 volt (95%CI, 0,889-1,0). 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 (95% CI, 0,978-1,0). A cut-off értéke, 15 U/ml optimális volt a BP180 és a BP230 teszt esetén az ASPT-ben. Az AUC értékek BP180 és BP230 antitestek esetén 0,870 (95% CI, 0,796-0,943) és 0,838 (95% CI, 0,756-0,919) voltak. A col7 teljesítménye az ASPT-ben 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 (95% CI, 0,983-1,0). 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.



32. ábra. ROC analízis: dsg1, dsg3, BP180, BP230 és col7 értékek.

A fenti specificitás értékek a kontroll szérummal lettek kiszámolva. Az ASPT teszt viszont mutatott néhány álpozitív eredményt olyan betegek szérumával, akik más autoimmun betegségben szenvednek. PF-ben a BP180 3 esetben volt álpozitív; habár

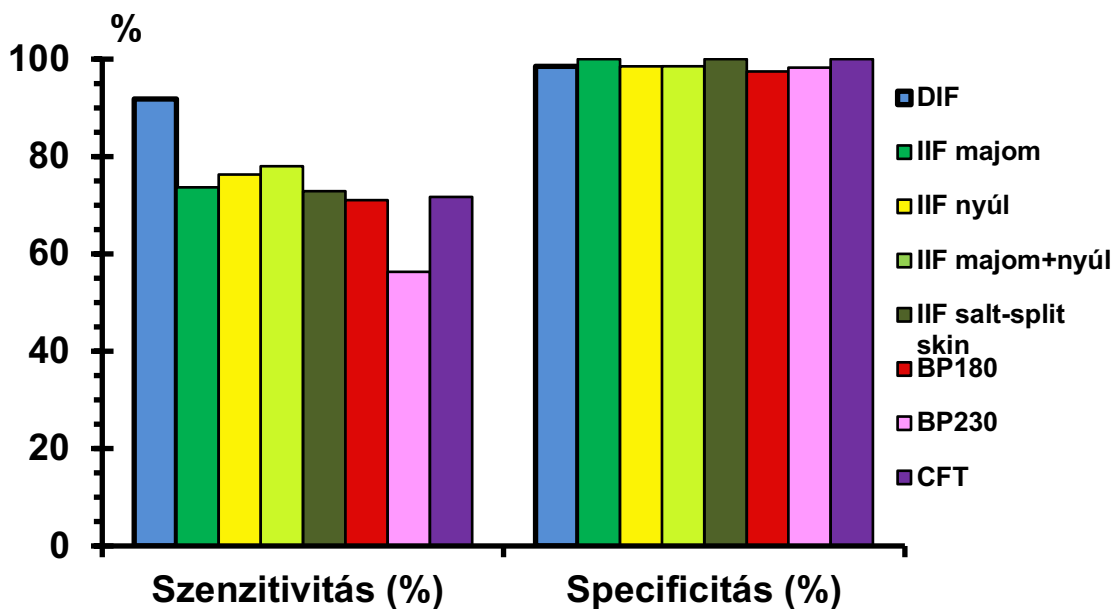
az értékek minden esetben a pozitív tartományt épp csak elérték (15,2, 15,4, 17,8 U/ml), és az IIF valamint a klinikai kép egyértelműen PF-t mutatott. Három PV-s beteg széruma volt álpozitív BP180-ra (önmagában), BP230-ra (önmagában), és egyidejűleg BP180 és BP230-ra. A klinikai kép, a DIF és az IIF alapján, két beteg csak PV-ban szenvedett bármiféle overlap-szindrómára utaló jel nélkül. A harmadik esetben, ahol BP180 és BP230 egyidejűleg pozitív volt, 4 évvel ezelőtt diagnosztizáltak pemphigust. A diagnózist IIF, dsG3 ELISA, DIF és szövettan is igazolta, így a minta mint PV-utánkövetés lett kiválasztva az ASPT teszteléséhez. Az ASPT-vel mindkét vizsgált desmoglein negatív lett, viszont a BP180 és a BP230 egyértelműen pozitív (30 U/ml körüli értékekkel), s ezen eredményt megerősítette a hagyományos ELISA kitekkel történő vizsgálat is. A betegnek orális relapszusa volt immunszuppresszív terápia alatt a mintavétel idején, de a desmoglein ELISA-k negatívok maradtak. A szérumot beküldtük immunoblot vizsgálatra, mely a BP180 és a BP230 pozitivitást is megerősítette. Az ASPT nélkül ez az epitóp terjedés nem került volna felismerésre.

A BP-s betegek esetén 4 álpozitív szérumot találtunk; kettő dsG1, egy dsG3 és egy col7 pozitivitást mutatott. Sem egyéb laboratóriumi, sem klinikai jele nem volt overlap-szindrómának ezekben az esetekben. A col7-álpozitív szérum sem az ASPT sem más col7 ELISA kittel nem mutatott pozitivitást (28,5 U/ml versus 2,38 és 2,44 U/ml), s a betegnek nem volt EBA-ra jellemző klinikai tünete. Két EBA szérum volt álpozitív dsG1-re, és három BP180-ra. Itt meg kell jegyeznünk, hogy csak limitált hozzáférésünk volt a klinikai adatokhoz, így nem zárható ki biztonsággal az overlap-szindróma eshetősége. A negatív kontrollok között egy borderline álpozitív szérumot találtunk BP180-ra (16,0 U/ml) amely korábbi ELISA és IIF vizsgálatokkal is negatívnak bizonyult.

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

300 BP-s beteg szérumát használtuk a CFT-hez (151 férfi, 149 nő), az átlagéletkoruk 76,9 év volt (8,7-96,4), összehasonlításként pedig 136 kontroll szérumot használtunk (52 férfi, 84 nő), az átlagéletkor 60,2 év (16,7-93,0) volt. 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 IIF-re, e kettőre együtt, valamint sóhasított bőrre nézve: 91,8%, 71%, 56,4%, 73,7%, 76,3%, 78% és 72,9%, ebben a sorrendben (ld. 33. ábra, ill. 6. táblázat).



33. ábra. Különböző diagnosztikus eljárások összehasonlítása bullösus pemphigoidban

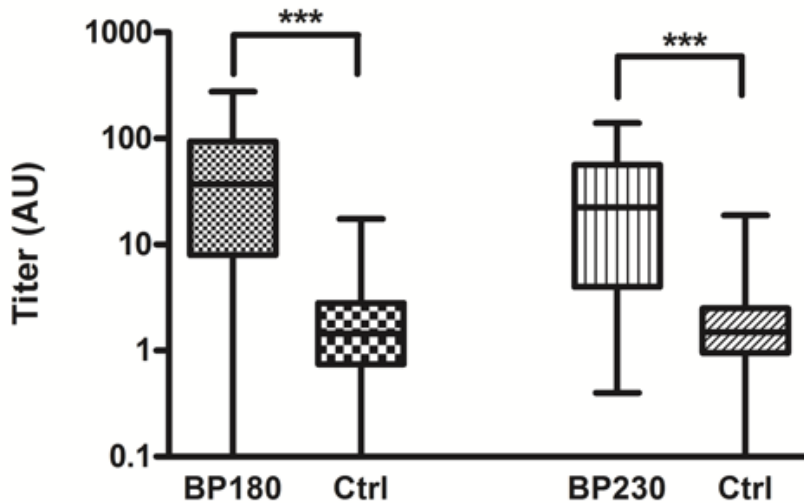
6. táblázat. Betegek száma, szenzitivitás, specifitás, pozitív és negatív prediktív értékek különböző diagnosztikus eljárásokban

Teszt	BP-s betegek (fő)	Kontroll betegek (fő)	Szenzitivitás	Specifitás %	Pozitív prediktív érték %	Negatív prediktív érték %
DIF	220	70	91,8% (95%CI: 87,4%-95,1%)	98,57% (95% CI: 92,3%-100%)	99,51% (95% CI: 97,3%-100%)	79,31% (95% CI: 69,3%-87,3%)
IIF majom	300	136	73,67% (95% CI:	100% (95% CI: 97,3%-100%)	100% (95% CI: 98,3%-100%)	63,26% (95% CI:

			68,3%- 78,6%)			56,4%- 69,7%)
IIF nyúl	300	136	76,33% (95% CI: 71,1%- 81,0%)	98,53% (95% CI: 94,8%- 99,8%)	99,13% (95% CI: 96,9%- 99,9%)	65,37% (95% CI: 58,4%- 71,9%)
IIF majom+ nyúl együtt	300	136	78,0% (95% CI: 72,9%- 82,6%)	98,53% (95% CI: 94,8%- 99,8%)	99,15% (95% CI: 97,0%- 99,9%)	67,00% (95% CI: 60,0%- 73,5%)
IIF só- hasított bőr	287	58	72,87% (95% CI: 67,3%- 77,9%)	100% (95% CI: 93,8%- 100%)	100% (95% CI: 98,3%- 100%)	42,65% (95% CI: 34,2%- 51,4%)
BP180	297	118	71,04% (95% CI: 65,5%- 76,1%)	97,46% (95% CI: 92,8%- 99,5%)	98,60% (95% CI: 96,0%- 99,7%)	57,21% (95% CI: 50,1%- 64,2%)
BP230	291	115	56,36% (95% CI: 50,5%- 62,1%)	98,3% (95% CI: 93,9%- 99,8%)	98,80% (95% CI: 95,7%- 99,9%)	47,08% (95% CI: 40,6%- 53,6%)
CFT	300	136	71,7% (95% CI: 66,2%- 76,7%)	100% (95% CI: 97,3%- 100%)	100% (95% CI: 98,3%- 100%)	61,5% (95% CI: 54,8%- 68,0%)

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 (34. ábra).



34. ábra. BP180 és BP230 ELISA közötti titerek BP-ben és kontroll (Ctrl) betegek esetén, logaritmikusan ábrázolva. ***, szignifikáns különbség, $P < 0,001$.

Minden kontroll szérum negatív volt a CFT-ben, így a CFT specificitása 100% volt. A DIF, a BP180 ELISA, a BP230 ELISA, az IIF majom, IIF nyúl, IIF majom és nyúl nyelőcsőben együtt, IIF sóhasított humán bőrön 98,6%, 97,5%, 98,3%, 100%, 98,5%, 98,5%, és 100% specificitást mutatott (33. ábra, 6. táblázat).

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 BP-s beteg szérumában volt pozitív a 46-ból (43,5%), amely BP-s betegek mindkét ELISA-ban negatívak voltak. Amennyiben a CFT-t kombináljuk majom és nyúl nyelőcső IIF-val, 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 nyelőcsőben. 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 DIF negatív volt.

3. IIF altípusok használatának lehetősége a BP diagnosztikájában

3.1 A szubsztrátok specificitása és szenzitivitása

A vizsgálati módszer beállítása során 3 anyagot teszteltünk: majom nyelőcső, nyúl nyelőcső és sóhasított emberi bőr. A nyúl nyelőcső szenzitivitása és a humán bőr specificitása jelentősen alulmúlták a várakozásainkat, így csak a majom nyelőcső volt alkalmas további vizsgálatra. Az első két eset technikai hibáinak eredetét nem vizsgáltuk. A „pilot” vizsgálat során monoklonális IgG2 antitesteket is teszteltünk, de mivel nonspecifikus kötődést mutatott, alkalmatlan volt a további vizsgálatra.

3.2 Standard IIF

Mind a 64 BP-s szérum negatív volt a hagyományos IIF technikával. Minden kontroll a laborunkban elérhető összes IIF-ben, valamint a BP180 és BP230 ELISA-ban 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.

3.3 DIF

A DIF 59 (92,2%) BP-s betegben volt pozitív, 1 esetben negatív (1,5%); 4 (6,3%) esetben pedig nem volt elérhető (nem készült vizsgálat a mi laborunkban, s az esetleges biopsziából származó klinikai adat nem állt rendelkezésünkre). DIF 9 kontroll beteg esetén volt elérhető (mivel nem volt célunk csak kutatási célra biopsziát venni a kontrollbetegekből), s ez mind negatív volt.

Abban az egy BPs esetben, amelyben a DIF negatív volt, a BP230 ELISA pozitív lett (titer: 27 U/ml; normál tartomány: < 9 U/ml), és az IIF sóhasított bőrön lineáris epidermális IgG felrakódást mutatott. Abban a 4 esetben, ahol DIF nem volt elérhető, a BP180 ELISA erősen pozitív volt (titerek > 27 U/ml; normál: < 9 U/ml). Mind az 5 beteg klinikailag BP-ben szenvedett, s a hisztológia megerősítette a diagnózist.

3.4 Indirekt immunfluoreszcencia az IgG alcsoportokkal

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 kocktállal. A szenzitivitás és specificitás számolásához minden szérum vagy negatív, vagy pozitív kategóriához lett sorolva.

Sajnos erről nem tudunk fotódokumentációt készíteni, mert a minimális fluoreszcencia különbségek az elérhető technikai feltételek mellett nem voltak vizualizálhatók. A határesetek számában jelentkező különbség visszavezethető arra, hogy az IgG1 antitestek intenzívebb háttérfestődést mutattak, mint az IgG4 antitestek.

A vizsgálati eredményeket a 7. táblázat mutatja. Az IgG1, IgG3, IgG4 és a hármas koktél használatával a 64 szérumból 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.

7. táblázat. Az IgG altípusok szenzitivitása, specificitása, pozitív és negatív prediktív értékei

Teszt	Szenzitivitás % (95% CI)	Specificitás % (95% CI)	Pozitív prediktív érték % (95% CI)	Negatív prediktív érték % (95% CI)
IgG ₁ IIF	45,3 (32,8- 58,3)	100 (91,8-100)	100 (88,1-100)	55,1 (43,4- 66,4)
IgG ₃ IIF	18,8 (10,1- 30,5)	100 (91,8-100)	100 (73,5-100)	45,3 (35,0- 55,8)
IgG ₄ IIF	32,8 (21,6- 45,7)	100 (91,8-100)	100 (83,9-100)	50,0 (39,0- 61,0)
Antitest koktél - IIF	48,4 (35,8- 61,3)	97,7 (87,7- 99,9)	96,9 (83,8-99,9)	56,0 (44,1- 67,5)
A fenti IIF-ek kombinációja	62,5 (49,5- 74,3)	97,7 (87,7- 99,9)	97,8 (88,2-99,9)	67,7 (54,7- 79,1)

Az antitestkoktél nem korrelált pontosan az IgG altípusokkal kapott eredményekkel. Rendkívül érdekes, hogy 12 szérumból 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 szérumból (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 (8. táblázat). 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 szérumból (50%) festődött legalább egy antitesttel.

8. táblázat. Festődés az egyes IgG alosztályokban ill. ezek kombinációjában

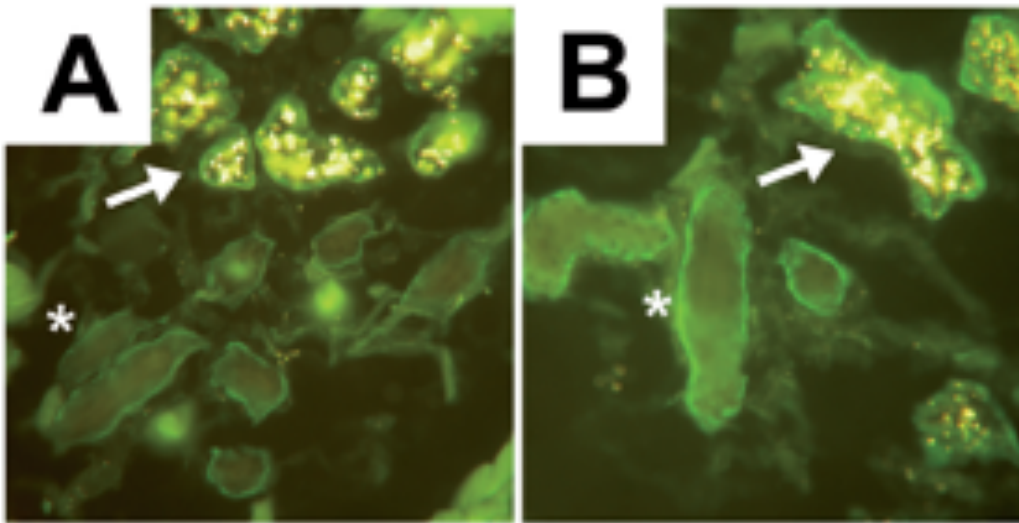
IgG altípus	Darab (%)
IgG ₁	9 (14,1)
IgG ₃	4 (6,3)
IgG ₄	7 (10,9)
IgG ₁ +IgG ₃	6 (9,4)
IgG ₁ +IgG ₄	12 (18,8)
IgG ₃ +IgG ₄	0 (0,0)
IgG ₁ +IgG ₃ +IgG ₄	2 (3,1)
Koktél	4 (6,3)
Nincs festődés	20 (31,3)
Összesen	64 (100)

4. A mirigykivezetőcsövek vizsgálata

64 BPs beteg metszeteit (30 nő, 34 férfi; átlagéletkor 78 év, tartomány: 8-96 év) vizsgáltuk, és összehasonlítottuk 82 kontroll beteggel (43 nő, 39 férfi, átlagéletkor 63 év, tartomány: 18-90 év).

4.1 BP180 és BP230 vizsgálata

Az anti-BP180 és anti-BP230 antitestek az epidermis, a verejtékmirigy kivezetőcsövek (VMK), a verejtékmirigyek és a szőrtüszők mentén lineáris fluoreszcenciát mutattak (35/A és B ábra).



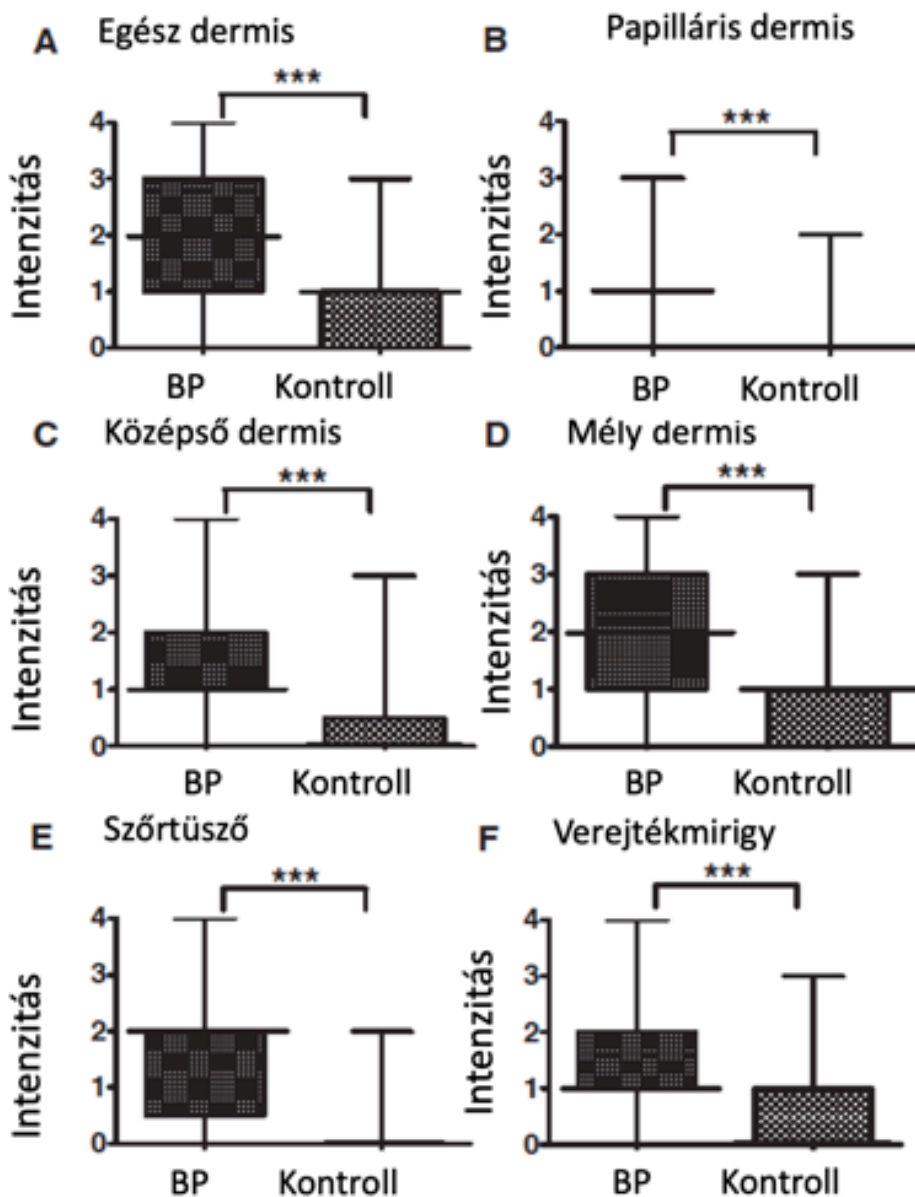
35. ábra. Anti-BP180 (A) és anti-BP230 (B) festődés a VMK (csillag), ill. a verejtékmirigyek (nyíl) mentén.

4.2 Az adnexumok fluoreszcenciája

4.2.1 A VMK fluoreszcenciája

A VMK-t ovális vagy tubuláris struktúrákként láthatjuk a teljes dermisben. Bár a fluoreszcens festékekkel festett metszeteken nem annyira jól kivehető, a vékony lument határoló monomorf, kuboidális sejtek két rétege alkotja a kivezetőcsöveket. Ezzel ellentétben a verejtékmirigyek a dermis mélyebb rétegeiben találhatóak, egy sejt sor látható a tágabb lumen mentén és lipofuszcín granulumok figyelhetők meg a lumenben (a különbség jól megfigyelhető a 35. ábrán).

58 (90,6%) BP-s és 44 (53,7%) kontroll beteg mutatott lineáris fluoreszcenciát a kivezetőcsövek mentén. A VMK fluoreszcenciája szignifikánsan intenzívebb volt BP-ben, mint a kontroll betegekben ($P < 0,0001$) (36/A ábra). A VMK-fluoreszcencia 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 VMK-fluoreszcencia mutatta a legalacsonyabb szenzitivitást (31,2%) és a legmagasabb specificitást (97,5%) (9. és 10. táblázat, 36. ábra). A mirigy-kivezetőcsövek fluoreszcenciája nem korrelált szignifikánsan a BP180 és BP230 értékekkel.



36. ábra. A fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása BP és kontroll betegek esetén. (A) A BP-s betegek VMK fluoreszcenciája erősebb volt BP-s betegekben a dermis egészében, mint a kontroll betegeké, (B) papilláris dermis, (C) középső dermis, (D) mély dermis. A BP-s betegek fluoreszcenciája szignifikánsan erősebb volt (E) a szórtüszők és (F) verejtékmirigyek esetén, mint kontroll személyeknél. ***, szignifikáns különbség, $P < 0.001$.

9. táblázat. Az adnexumok szenzitivitása (%)

	VMK				Szórtüsző	Verejték-mirigy
	Egész dermis	Papilláris dermis	Középső dermis	Mély dermis		
Intenzitás >0	90,6	85,3	83,3	83,0	75,0	85,7
Intenzitás >1	56,3	20,6	27,1	61,7	55,0	35,7
Intenzitás >2	31,3	2,9	12,6	36,2	15,0	14,3

10. táblázat. A bőrfüggelékek specificitása (%)

	VMK				Szórtüsző	Verejték-mirigy
	Egész dermis	Papilláris dermis	Középső dermis	Mély dermis		
Intenzitás >0	46,3	76,9	75,9	43,9	87,9	68,4

Intenzitás						
>1	82,9	98,1	91,4	83,3	96,9	89,5
Intenzitás						
>2	97,6	100	98,3	98,5	100	94,7

4.2.2 A verejtékmirigy-kivezetőcsövek vizsgálata a papilláris dermisben

A papilláris dermisben 34 BP-s és (53,1%) 51 (62,2%) kontrollbeteg metszetén találtunk mirigykivezetőcsövet. A BP-s betegek közül 5 (14,7%) nem mutatott fluoreszcenciát a VMK mentén, 29 (85,3%) viszont igen; 1-es intenzitású volt 22 (64,7%), 2-es 6 (17,6%), és 3-as 1 (2,9%) eset. Kontroll betegek között 39 (76,5%) nem mutatott fluoreszcenciát a ductális bazálmembrán (BM) mentén, míg 12 (23,5%) mutatott, 1-es intenzitásút 11 (21,5%) metszet, 2-es intenzitásút 1 (2%) metszet. A papilláris dermisben szignifikánsan különbözött a BP-s és a kontroll betegek fluoreszcenciájának intenzitása ($P < 0,0001$) (36/B ábra). A papilláris dermisben pozitív VMK mutatták - bármelyik intenzitásra nézve - a legmagasabb szenzitivitást (89,2%), 3-as és 4-es intenzitásra nézve pedig a legmagasabb specificitást (100%). (Az adatok az 9. és 10. táblázatban vannak szemléltetve).

4.2.3 A VMK fluoreszcenciája a középső dermisben

A dermis középső részén 48 (75%) BP-s és 57 (69,5%) kontroll beteg esetén találtunk VMK-t. 8 (16,7%) BP-s minta nem fluoreszkált, 40 (83,3%) pedig mutatott fluoreszcenciát 1, 2, 3, és 4-es intenzitással. 1-es intenzitás volt fellelhető 27 (56,3%) esetben, 2-es intenzitás 7 (14,6%) esetben, 3-as intenzitás 3 (6,2%) esetben, és 4-es intenzitás 3 (6,2%) esetben. A kontroll betegek között 43 (75,4%) nem mutatott fluoreszcenciát, míg 14 (24,6%) mutatott 1, 2 és 3-as intenzitással. 9 eset mutatott 1-es intenzitást (15,8%), 4 eset 2-est (7%) és mindössze 1 eset 3-ast (1,8%). A VMK fluoreszcencia-intenzitása BP és kontroll betegek esetén szignifikánsan ($P < 0,0001$) különbözött (36/C ábra). A szenzitivitás és a specificitás értékek 83,3% és 75,9%-nak adódtak (mindegyik intenzitásra nézve). A VMK, melyek 3-as és 4-es intenzitású festődést mutattak, 98,3% specificitással jellemezhetőek a középső dermisben, míg a szenzitivitás 12,5% volt (9. és 10. táblázat).

4.2.4 A VMK fluoreszcenciája a dermis mélyebb részein

A mély dermisben 47 (73,4%) BPs és 65 (79,2%) kontroll beteg mutatott fluoreszcenciát. A BP-s betegek közül 8 (17%) nem mutatott fluoreszcenciát, míg 39 (83%) beteg lineáris fluoreszcenciát mutatott a ductális BM mentén. 1-es intenzitást 10 (21,3%), 2-es intenzitást 12 (25,5%), 3-as intenzitást 13 (27,7%) és 4-es intenzitást 4 (8,5%) eset. A kontrollminták jellemzői: 29 (44,6%) nem mutatott fluoreszcenciát, 36 (55,4%) igen, 1, 2 és 3-as intenzitással. 1-es intenzitás jellemzett 25 (38,5%) mintát, 2-es intenzitás 10 (15,4%) mintát és 1-es intenzitás 1 (1,5%) mintát. A fluoreszcenciák intenzitása a dermis mélyebb részén szignifikánsan különbözött a BP-s és a kontroll betegek esetén ($P < 0.0001$) (**3/D Ábra**). Szabadon megválasztott fluoreszcencia mellett a dermis mélyebb rétegének a VMK fluoreszcenciája 83% szenzitivitást mutatott. A specificitás alacsonyabb volt, mint a dermis felsőbb szakaszain (43,9%), de külön 3-as és 4-es fluoreszcenciára nézve elérte a 98,5%-ot (**2. Táblázat**), 36,2% szenzitivitás mellett.

4.2.5 A szőrtüszők fluoreszcenciája

20 (31,2%) BPs beteg mintáján figyelhetünk meg szőrtüsző fluoreszcenciát 0, 1, 2, 3 és 4-es intenzitással. 5 (25%) beteg esetén nem mutatkozott fluoreszcencia, 1-es intenzitást figyeltünk meg 4 (20%), 2-es intenzitást 8 (40%), 3-as intenzitást 1 (5%), és 4-es intenzitást 2 (10%) esetben. 33 (40,2%) kontroll betegnél volt megfigyelhető szőrtüsző, 0, 1, és 2-es intenzitással. 29 (87,9%), tehát a legtöbb esetben nem volt fluoreszcencia, 3 esetben (9,1%) 1-es, és 1 (3%) esetben 2-es erősségű. A szőrtüszők fluoreszcenciája szignifikánsan különbözött BP és kontroll betegek esetén ($P < 0,0001$) (36/E ábra). A szenzitivitás és a specificitás 75% ill. 87,9%-nak adódott. A szenzitivitás csökkent 3-as és 4-es intenzitásra nézve (15%), de ez mutatta a legnagyobb specificitást (100%) (9. és 10. táblázat).

4.2.6 A verejtékmirigyek fluoreszcenciája

14 (21,8%) BP-s beteg mintájában volt megfigyelhető verejtékmirigy. 2 (14,3%) esetben nem mutatkozott fluoreszcencia, 7 (50%) esetben 1-es intenzitású, 3 (2,4%) esetben 2-es intenzitású, 1 (7,1%) esetben 3-as, és 1 (7,1%) esetben 4-es intenzitású.

19 (23,2%) kontroll betegnél láttunk verejtékmirigyet, ebből 13 (68,4%) nem mutatott fluoreszcenciát, 4 (21,1%) 1-es erősségűt, 1 (5,3%) 2-es erősségűt és 1 (5,3%) 3-as erősségűt. A fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan különbözött BP és kontroll

betegek esetén ($P=0,0045$) (36/F ábra). Az összes intenzitást együtt vizsgálva a szenzitivitás 85,7%-nak, a specificitás 68,4%-nak adódott. A specificitás 94,7%-ra növekedett 3 és 4-es intenzitás esetén (9. és 10. táblázat).

V. Megbeszélés

1. A "MESACUP anti-Skin profile TEST" vizsgálata

A desmoglein ELISA kitek szenzitivitása és specificitása a szakirodalom szerint nem egységes, még egy gyártó azonos terméke esetén sem (ld. 1. és 2. táblázat). Az irodalmi adatok szerint dsG1 ELISA esetén, PF-ban vizsgálva a szenzitivitás 96%-100% között változik, a specificitás 95,7%-99,1% között. A PV dsG3 ELISA-t hasonló értékek jellemzik: a szenzitivitás 85,2%-100% között mozog (a legtöbb studyban 94%-100%), a specificitás 95,7%-100%-os értékeket mutat (ld. 1. és 2. táblázat). Minden dsG1 és 3 ELISA kiváló diagnosztikai eszköz, az ASPT-t is beleértve. A szenzitivitás és specificitás értékek nem különböztek a szakirodalomtól. Néhány BP szérum álpozitív eredményeket mutatott a desmogleinek vizsgálatakor az ASPT-ben. Ez a megfigyelés a specifikus ELISA kitekre is jellemző, 15 éve ismert az irodalomban (Ishii és mtsai, 1997; Amagai és mtsai, 1999; Huang és mtsai, 2007; Schmidt és mtsai, 2010). Habár az overlap szindróma lehetősége nem zárható ki, minden esetben BP maradt a diagnózis a DIF és a klinikai adatok alapján.

A BP180 és BP230 szenzitivitás, ill. specificitás értékei a 3. és 4. táblázatban találhatóak. Az első ELISA megjelenése óta jelentős fejlődésen estek át ezek a tesztek. A szenzitivitás 1994-ben csupán 53% volt 100% specificitás mellett (Giudice és mtsai, 1994), de a későbbi vizsgálatokban is 69,9%-os szenzitivitás volt a legrosszabb eredmény (Yoshida és mtsai, 2006). A mi vizsgálatunkban alacsonyabb szenzitivitás és specificitás értékek mutatkoztak, mivel mi nem kimagasló értékek elérésére törekedtünk, hanem sok, a korábbi vizsgálatokban határérték pozitivitást mutató szérumot válogattunk be, hogy a kítet jobban megismerjük. Korábbi vizsgálatainkban nagyobb és szelektálatlan mintán (n = 313) a specifikus MBL kitek (BP180 és BP230) szenzitivitása 72% és 59% volt (Sárdy és mtsai, 2013); a jelen tanulmányban vizsgált szérumoké (n = 52) pedig 60% és 50% (100% specificitással). Az ASPT BP180 teszt szenzitivitása nem tér el jelentősen a korábbi tesztekétől, míg a BP230 szenzitivitása jelentősen javult, az ASPT 11,5%-kal jobban teljesített, mint a korábbi BP230 tesztek. Továbbá a BP180 és BP230 eredmények együttes vizsgálatából kiderült, hogy az ASPT magasabb szenzitivitást mutat, mint a korábbi ELISA eredmények (81% vs. 75%).

Chen és mtsai kifejlesztették az első VII-es típusú kollagén (col7) ELISA-t, 1997-

ben, ami egy nagyon szenzitív és specifikus eszköznek bizonyult (5. táblázat). Az ASPT 81% szenzitivitást és 100% specificitást mutatott. A szenzitivitás értékek nagyon változékonyak az irodalomban, és csak kevés study áll rendelkezésre alacsony betegszámmal (5. táblázat).

2. A komplement fixációs teszt vizsgálata

A komplement fixációs (herpes gestationis) faktor először 1973-ban került ismertetésre Provost és Tomasi által 2 herpes gestationisban szenvedő betegben, akiknél a CFT pozitív volt (Provost és mtsai, 1973). 1976-ban egyidejűleg két független kutatócsoport is felfedezte, hogy IgG a komplement kötő faktor, mely nem mindig detektálható hagyományos DIF és IIF tesztekkel, de aktiválja a klasszikus komplement útvonalat (Jordon és mtsai, 1976; Katz és mtsai, 1976). A CFT a többi szerológiai módszertől eltérő eljárás alapul, és alacsony titerű, komplement-aktiváló, bazálmembrán-ellenes IgG autoantitestek felfedezésére alkalmas. Emiatt munkahipotézisünk az volt, hogy olyan BP-s betegekben, akik a tradicionális szerológiai módszerekkel negatívok voltak, vagy a pozitivitás határán álltak, alacsony koncentrációjú IgG₁, IgG₂, és/vagy IgG₃ mutatható ki a CFT segítségével.

Hogy igazoljuk a hipotézisünket, elvégeztük a CFT-t nagy számú BP-s és kontroll szérumon, és azt találtuk, hogy általánosságban a CFT alkalmas BP diagnosztikájára, 71,7% szenzitivitással. Ez nem különbözött szignifikánsan más szerológiai tesztek eredményeitől. Ezen felül a CFT-t a többi teszttel együtt végezve a szenzitivitás nőtt (95,3%-ra) a specificitás csökkenése nélkül. Végezetül a CFT az olyan BP-s betegek 30-50%-át tudta diagnosztizálni, akik negatívok voltak minden más szerológiával, ill. ezek kombinációjával, s ez a teszt kifejezetten jó alkalmazhatóságát mutatja.

Információink szerint a CFT alkalmazhatóságát nem vizsgálták BP-ben az elmúlt 25 év során, és a korábbi studyk is vagy pemphigoid gestationisra fókuszáltak, vagy csak kis elemszámú BP-s csoportot vizsgáltak. 1975-ben Jordon és mtsai 46 BP-s szérumot vizsgáltak a CFT segítségével, és azt találták, hogy a teszt csupán a minta 54,3%-ban pozitív, annak ellenére, hogy a szérumok erősen pozitívok voltak normál bőrön készült IIF-ben (Jordon és mtsai, 1975). 1990-ben Fuligni és munkatársai 15 BP-s beteg szérumát vizsgálták, akiknél az IIF majom nyelőcsövön negatív volt, és azt találták, hogy 5 beteg

esetén (33%) pozitív lett a CFT (Fuligni és mtsai, 1990). A mi eredményeink jól összeillenek ezzel a vizsgálattal, hisz azon betegek 47%-ában volt pozitív a CFT, akiknél az IIF majom és nyúl nyelőcsövön is negatív volt. Az elmúlt 25 év során a szerológiai diagnosztika sokat fejlődött. Az IIF-ek szenzitivitása egyre jobb lett, és új ELISA-k jelentek meg, mi viszont nem találtunk aktuális, a CFT eredményességét BP-ben vizsgáló kutatást.

3. Az IgG alosztályok vizsgálata

Kevés vizsgálat áll rendelkezésre a keringő IgG-alsztály antitestekről. A korábbi vizsgálatok nem írták le a teszt specificitását, valamint alacsony esetszámmal dolgoztak, mindössze 25 és 30 beteggel (Kumar és mtsai, 1996; Lamb és mtsai 2008). Emiatt ezen vizsgálatok validitása megkérdőjelezhető. Az elővizsgálatok során megállapítottuk, hogy az antitestek IIF-ben a majom nyelőcsövön kívül minden más szövethez nonspecifikusan kötődnek, s majom nyelőcső esetén is abszorbeáló és blokkoló anyagokkal kellett kezelniük a mintát, hogy értékelhető fluoreszcenciát kapjunk. Az IgG2 így sem volt vizsgálható alacsony specificitása miatt. Mivel az IgG2 előfordulása relatíve ritka BP-ben, valószínűtlennek tekinthetjük, hogy használható lenne a diagnosztikában (Al-Karawi és mtsai, 2002; Bernard és mtsai, 1990; Bernard és mtsai, 1991; Bird és mtsai, 1986; Döpp és mtsai, 2000; Kumar és mtsai, 1996; Lamb és mtsai, 2008; Shirakata és mtsai, 1990; Soh és mtsai, 1991; Yamada és mtsai, 1989; Zhou és mtsai, 1998).

Több szerző leírta, hogy az IgG4 a predomináns autoantitest BP-ben, majd ezt követi az IgG1, IgG2, IgG3 (Al-Karawi és mtsai, 2002; Bernard és mtsai, 1990; Bernard és mtsai, 1991; Bird és mtsai, 1986; Döpp és mtsai, 2000; Lamb és mtsai, 2008; Shirakata és mtsai, 1990; Soh és mtsai, 1991; Yamada és mtsai, 1989). Mindössze egy study mutatta, hogy az IgG1 ugyanolyan gyakori, mint az IgG4 (Zhou és mtsai, 1998), és egy, hogy IgG4 talán az egyetlen jelen levő antitest prodromális BP-ben (Lamb és mtsai, 2008). Mi azt találtuk, hogy az IgG4 és az IgG1 előfordulása közötti különbség nem szignifikáns, de az IgG1 valamivel gyakrabban fordult elő. Mivel a mi vizsgálatunkban csak olyan szérumok vettek részt, melyek a tradicionális IIF-fel negatívak voltak, így ez nem állítható szembe a szakirodalommal.

A hagyományos IIF mikroszkópia szenzitivitása majom nyelőcsövön a 60–80%-

os tartományba esik (Di Zenzo és mtsai; 2012; Sárdy és mtsai, 2013), a mi laborunkban korábbi vizsgálatok alapján 73,2% (Sárdy és mtsai, 2013). Jelenlegi vizsgálatunk szerint körülbelül a tradicionális majom nyelőcső IIF-fel álnegatív BPs szérumok 30–50%-a diagnosztizálható lenne az IgG alosztály antitestek használatával, így e kétlépcsős teszt (először hagyományos IgG, majd negatív esetben IgG-alosztály IIF) szenzitivitása a 80–87%-os tartományba esne. Kumar és munkatársai 25 álnegatív esetet vizsgáltak (Kumar és mtsai, 1996) és a szenzitivitás hasonló növekedését írták le (68,5%-ról 91%-ra), míg Lamb és mtsai 30 beteget vizsgáltak prodromális BP-vel, és a szenzitivitás növekedését találtál 36,6%-ról 56,6%-ra (Lamb és mtsai, 2008). Mindkét kutatócsoport monoklonális anti-IgG alcsoport antitestet használt majom nyelőcsövön, ami elméletileg specifikus, de egyik csoport sem határozott meg a specificitást. A mi adataink konzisztensek e két korábbi vizsgálatéval.

Az IgG3 alosztály antitestek relatíve rossz diagnosztikus teljesítményt mutattak, ezért használatuk nem volt megfelelően költséghatékony, csak antitestkóktól részeként alkalmaznánk ezeket a jövőben.

4. A VMK vizsgálata

A szakirodalomban fellelhetők olyan cikkek, melyek a szőrtüszők, valamint a verejtékmirigyek és ezek kivezetőcsöveinek immunreaktivitását mutatják DH-ban (Barnadas és mtsai, 2016), pemphigusban és BP-ben (Abreu-Velez és mtsai, 2009 és 2013). Az adnexumokban rejlő diagnosztikai lehetőségeket is vizsgálták. Lehman és mtsai kimutatták 2013-ban, hogy a pilosebaceus egységek és a verejtékmirigyek fluoreszcenciája magas szenzitivitást mutat különböző immunobullózisokban, és utal rá, hogy amennyiben hiányoznak a klasszikus diagnosztikához szükséges struktúrák, használatuk hasznos lehet. Zhou és mtsai kimutatták, hogy az ekkrin apparátust jellemző szenzitivitás hasonló az epidermiséhez és a szőrtüszőkéhez PV-ben és BP-ben (Zhou és mtsai, 2016). A mi kutatásunk annyiban különbözik e korábbiaktól, hogy kontrollesoportot is vizsgáltunk, így specificitást is tudunk számítani.

A mi vizsgálatunkban a VMK pozitivitása BP esetében a dermis minden részén szignifikánsan erősebb volt, mint a kontrollesoporté. Ezen kívül a szőrtüszők és a faggyúmirigyek kivezetőcsövei is szignifikánsan erősebben fluoreszkálnak.

Eredményeink így megegyeznek korábbi vizsgálatok eredményeivel (Lehman és mtsai, 2013; Zhou és mtsai, 2016).

A korábbi vizsgálatokkal ellentétben mi megvizsgáltuk a fluoreszcencia intenzitását a dermis különböző rétegeiben, s azt állapítottuk meg, hogy mindenhol szignifikánsan különbözik a BP-s és a kontroll betegek adnexumainak fluoreszcenciája. Azt is megfigyelhettük, hogy a fluoreszcencia csak 3-as és 4-es intenzitás-erősség esetén elég specifikus ahhoz, hogy segítségünkre legyen a diagnosztikában.

Megfigyeltük a rutindiagnosztika során, hogy a verejtékmirigyek diagnózistól függetlenül szinte mindig fluoreszkálnak. Öt random szelektált metszetet megfestettünk egy másik FITC-jelölt antitesttel is (nyúl anti-humán IgG, γ -lánc, Dako-Biozol, Eching, Németország), de a fluoreszcencia mértéke nem változott. Ez a megfigyelés tehát feltehetően nem laborhiba, és más szerzők is megfigyelték, hogy az eccrin verejtékmirigyek autofluoreszcenciát mutatnak fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva (Zhao és mtsai, 2016). A mirigykivezetőcsövekre ez nem volt jellemző, így csak ezeknek javasolunk szerepet a diagnosztikában.

Habár a VMK bazálmembránja menti IgG csapadék relatíve magas szenzitivitást mutat BP-ben, nincs bizonyíték arra, hogy a verejtékmirigyek bármilyen szerepet játszanának a BP patogenezisében. Indirekt kapcsolat viszont lehetséges, ezt ismertetném a következőkben.

BP-t indukálhatnak gyógyszerek (pl. gliptinek, spironolakton, fenotiazin, furoszemid), vírusfertőzés vagy egyéb fizikai faktorok is (Lo Schiavo és mtsai, 2013). Az is ismert, hogy egyes gyógyszerek ekkrin mirigyeken keresztül történő exkréciója lehetséges; sőt, betegségekhez is vezethet, pl. neutrophil eccrin hidradenitis, szimmetrikus gyógyszer-eredetű intertriginózus és hajlati exantéma (az ún. „SDRIFE”) vagy erythema multiforme (Wenzel és mtsai, 1998). Az ekkrin akrosyngium MHC-II antigéneket exprimál, melyeknek szerepe lehet külső ágensek elleni védekezésben (McGregor és mtsai, 1991). Emiatt a gyógyszerek direkt toxikus hatásán túl a verejtékmirigyek immunológiai reakciója is létrejöhet. Kimutattuk, hogy BP180 és BP230 megtalálható a verejtékmirigyeken és kivezetőcsöveiken is, s ez felveti a kérdést, hogy a BP180 és BP230 elleni immuntolerancia elvesztése vajon kiindulhat-e verejtékmirigyekből, mely az autoimmun választ triggereli.

Egy korábbi vizsgálat (Zhou és mtsai, 2016), ill. a mi eredményeink is azt mutatták, hogy BP-s betegek metszetein néhol csak a VMK mutat lineáris fluoreszcenciát, míg az epidermális bazálmembrán nem. Az egyelőre kérdéses, hogy ez diagnosztikus értékű-e pemphigoidban.

VI. 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.

A CFT segíti a BP diagnosztikáját, mivel más szerológiai tesztek által fel nem fedezett antitesteket is kimutat. Emiatt az alkalmazása hasznos lehet inkonzisztens eredmények, ill. passzoló klinikai kép, de negatív szerológiai diagnosztika esetén.

Két lépcsőben jelentősen növelhető az IIF szenzitivitása majomnyelőcsövön, ha a standard vizsgálatokkal negatív szérumokat a különböző IgG alosztályokkal is megvizsgáljuk.

A verejtékmirigy-kivezetőcsövek intenzív fluoreszcenciája jellemző BP-re, a kontrollbetegekre viszont nem. Viszont az alacsonyabb intenzitású fluoreszcenciát alacsony specificitása miatt nem találtuk diagnosztikus értékűnek.

VII. Összefoglalás

Az ASPT hasonló teljesítményű, mint a korábbi ELISA-k, így alkalmas a mindennapi diagnosztikai használatra. 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 a tény, hogy akár egyetlen egy beteg széruma is vizsgálható vele csövecskék pazarlása nélkül (nem kell összevární több szérumot, hogy gazdaságos legyen az elvégzése), 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 nemcsak 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.

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 javasolunk viszont annak eldöntésére, hogy milyen antitestkombináció alkalmazható valóban költséghatékonyan a mindennapi diagnosztikában.

A dermis minden rétegében megjelenő, a verejtékmirigy-kivezetőcsöveket jellemző lineáris IgG fluoreszcencia nagyon szenzitív jel BP-ben, viszont csak az erős festődés elfogadhatóan specifikus. A dermis magasabb szakaszain specifikusabb a kivezetőcsövek festődése. Amennyiben gyenge fluoreszcencia figyelhető meg a mirigykivezetőcsövek mentén, nem diagnosztikus BP-re, csak ha a klasszikus BM-fluoreszcencia is megfigyelhető. Fragmentált minta esetén tehát nagy óvatossággal járjunk el, diagnózis egyelőre nem alapulhat kizárólag a verejtékmirigy-kivezetőcsövek vizsgálatán.

VIII. Summary

In conclusion, the ASPT has a similar clinical performance to each previous, specific ELISA alone, so it is suitable for routine diagnostics. The BP230 test of the ASPT has been considerably improved compared to the previous BP230 ELISA. The incubation time of the ASPT is just half of that of the previous specific tests and the setup of the assay makes the testing of one single serum sample economic. In addition, the ASPT is an excellent tool to examine problematic sera, overlap syndromes, and it can also indicate the appearance of epitope spreading during follow-up.

CFT is useful for the diagnosis of not only pemphigoid gestationis but also BP, and we recommend to use it as a secondary test for patients who are either negative or borderline-positive for other serological assays or DIF. Given its high specificity, a positive result has a very high positive predictive value; false positive results are not expected. Thus it is especially useful for confirming borderline positive results and for the diagnosis of serologically challenging cases.

We showed that detection of mainly IgG1 and IgG4, but also IgG3 anti-subclass antibodies by IIF on monkey oesophagus significantly improved sensitivity and maintained the high specificity of the standard IIF, therefore their detection can be recommended for analysis of BP sera that are negative for traditional IIF microscopy. We recommend further studies to determine which secondary antibody cocktail (e.g. a mixture of anti-total-IgG with anti-IgG1 and anti-IgG4 subclass secondary antibodies) is most suitable for a cost-effective and efficient IIF assay for the diagnosis of BP.

In conclusion, linear deposits of IgG along the BM of sweat gland ducts (SGDs) are highly sensitive for BP in each level of dermis; however, only strong fluorescence has acceptable specificity. SGD positivity in the upper dermis was found to be more BP-specific than in the lower dermis. Thus, evaluation of the localization and the intensity of adnexal IgG fluorescence is important, and SGD immunoreactivity may have diagnostic relevance in BP. However, further controlled studies are necessary to recommend SGD fluorescence as the basis for diagnosis of BP (also in case of fragmented samples), even with strong signal intensity.

IX. Irodalomjegyzék

Abreu-Velez AM, Howard MS, Hashimoto K, Hashimoto T. (2009) Autoantibodies to sweat glands detected by different methods in serum and in tissue from patients affected by a new variant of endemic pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol Res*, 301: 711-718.

Abreu-Velez AM, Calle-Isaza J, Howard MS. (2013) A case of bullous pemphigoid with immunoreactivity to blood vessels and sweat glands. *Our Dermatol Online*, 4: 621.

Al-Karawi KS. (2002) Immunoglobulin G subclass distribution of bullous pemphigoid autoantibodies and complement fixation studies. *Saudi Med J*, 23: 1492.

Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T. (1999) Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol*, 140: 351-357.

Barnadas MA, Rubiales MV, González MJ, Puig L, García P, Baselga E, Pujol R, Alomar A, Gelpí C. (2008) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence testing in a bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis. *Int J Dermatol*, 47: 1245-1249.

Barnadas MA. (2016) Dermatitis herpetiformis: A review of direct immunofluorescence findings. *Am J Dermatopathol*, 38: 283-288.

Baum S, Sakka N, Artsi O, Trau H, Barzilai A. (2014) Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. *Autoimmun Rev*, 13: 482–489.

Bakker CV, Terra JB, Jonkman MF. (2014) Toward a practical renaming of bullous pemphigoid and all its variants-reply. *JAMA Dermatol*, 150: 459–460.

Bakker CV, Terra JB, Pas HH, Jonkman MF. (2013) Bullous pemphigoid as pruritus in the elderly: a common presentation. *JAMA Dermatol*, 149: 950–953.

Béné J, Moulis G, Bennani I, Auffret M, Coupe P, Babai S, Hillaire-Buys D, Micallef J, Gautier S. (2016) Bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase IV inhibitors:

a case-noncase study in the French pharmacovigilance database. *Br J Dermatol*, 175: 296–301.

Bernard P, Aucouturier P, Denis F, Bonnetblanc JM. (1990) Immunoblot analysis of IgG subclasses of circulating antibodies in bullous pemphigoid. *Clin Immunol Immunopathol*, 54: 484.

Bernard P, Prost C, Aucouturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM. (1991) The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*, 97: 259.

Blöcker IM, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Zillikens D, Schmidt E. (2012) Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*, 166: 964-970.

Bird P, Friedmann PS, Ling N, Bird AG, Thompson RA. (1986) Subclass distribution of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 86: 21.

Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiai Z, Barbe C, Tabary T, Grange F, Bernard P. (2011) Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol*, 147: 286-291.

Chan LS, Hammerberg C, Cooper KD. (1997) Significantly increased occurrence of HLA- DQB1*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 108: 129–132.

Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. (1997) Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*, 108: 68-72.

Chen R, Fairley JA, Zhao ML, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA, Liu Z. (2002) Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J Immunol*, 169: 3987–3992.

Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Döpp R, Partscht K, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D. (1999) IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. *J Invest Dermatol*, 113: 140-142.

Commin MH, Schmidt E, Duvert-Lehembre S, Lasek A, Morice C, Estival JL, Debarbieux S, Rigal E, Pauwels C, De Quatrebarbes J, Roussel A, Goujon E, Stoebner PE, Jouen F, Joly P. (2016) Clinical and immunological features and outcome of anti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol*, 175: 776-781

Cozzani E, Gasparini G, Burlando M, Drago F, Parodi A. (2015) Atypical presentations of bullous pemphigoid: clinical and immunopathological aspects. *Autoimmun Rev*, 14: 438–445.

Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, Mansoori P, Taheri A, Firooz A, Mortazavi H, Esmaili N, Dowlati Y. (2007) Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 21: 1319-1324.

Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, Janin A, Capron M. (1996) IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *J Immunol*, 157: 3642–3647.

Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R. (1996) A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8569–8571.

Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour JP, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. (2008) Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol*, 128: 415–426.

Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L. (2007) Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol*, 23: 257–288.

Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D. (2000) IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol*, 42: 577.

Fuligni A, Geti V, Di Blasi A, Cottoni F, Fabbri P. (1990) Il cosiddetto herpes gestationis factor nel pemfigoide bolloso. *G Ital Dermatol Venereol*, 125: 301-303.

Damoiseaux J, van Rijnsingen M, Warnemünde N, Dährnich C, Fechner K, Tervaert JW. (2012) Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the EUROPLUSTM Dermatology Mosaic. *J Immunol Methods*, 382: 76-80.

De A, Rao R, Balachandran C. (2010) Salt split technique: a useful tool in the diagnosis of subepidermal bullous disorders. *Indian J Dermatol*, 55: 334–336.

Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, Borradori L. (2012) Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol*, 30: 3.

Giudice GJ, Wilske KC, Anhalt GJ, Fairley JA, Taylor AF, Emery DJ, Hoffman RG, Diaz LA. (1994) Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol*, 102: 878-881.

Grando SA. (2015) The mitochondrion is a common target of disease pathophysiology in pemphigus and pemphigoid. *Exp Dermatol*, 24:655–656.

Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, Tamizifar B, AmirZargar A, Sharma VK, Prasad HR, Khandpur S, Kumar A. (2006) Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol*, 45: 518-522.

Hirose M, Schilf P, Benoit S, Eming R, Gläser R, Homey B, Kunz M, Nebel A, Peitsch WK, Pföhler C, Sárdy M, Schreiber S, Zillikens D, Schmidt E, Ibrahim SM; German AIBD Genetic Study Group. (2015) Polymorphisms in the mitochondrially encoded ATP synthase 8 gene are associated with susceptibility to bullous pemphigoid in the German population. *Exp Dermatol*, 24: 715–717.

Hofmann S, Thoma-Uszynski S, Hunziker T, Bernard P, Koebnick C, Stauber A, Schuler G, Borradori L, Hertl M. (2002) Severity and phenotype of bullous pemphigoid

relate to autoantibody profile against the NH₂- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *J Invest Dermatol*, 119: 1065-1073.

Hofmann SC, Weidinger A. (2019) Epidermolysis bullosa acquisita. *Hautarzt*, 70: 265-270.

Huang CH, Chen CC, Wang CJ, Chang YT, Liu HN. (2007) Using desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay as an adjunct diagnostic tool for pemphigus. *J Chin Med Assoc*, 70: 65-70.

Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. (1997) Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol*, 159: 2010-2017.

James KA, Culton DA, Diaz LA. (2011) Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin*, 29: 405.

Jeong SJ, Lee CW. (1995) Bullous pemphigoid: persistent lesions of eczematous/urticarial erythemas. *Cutis*, 56: 225–226.

Jordon RE, Heine KG, Tappeiner G, Bushkell LL, Provost TT. (1976) The immunopathology of herpes gestationis. Immunofluorescence studies and characterization of "HG factor". *J Clin Invest*, 57: 1426-1431.

Jordon RE, Nordby JM, Milstein H. (1975) The complement system in bullous pemphigoid. III. Fixation of C1q and C4 by pemphigoid antibody. *J Lab Clin Med*, 86: 733-740.

Juratli HA, Sárdy M. (2019) Linear IgA bullous dermatosis. *Hautarzt*, 70 :254-259.

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. (2017) Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17026.

Katz SI, Hertz KC, Yaoita H. (1976) Herpes gestationis. Immunopathology and characterization of the HG factor. *J Clin Invest*, 57: 1434-1441.

Kim JH, Kim YH, Kim S, Noh EB, Kim SE, Vorobyev A, Schmidt E, Zillikens D, Kim SC. (2013) Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27: e224-230.

Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T. (2002) BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*, 30: 224-232.

Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman MF, Ludwig RJ, Bieber K. (2019) Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front Med (Lausanne)*, 5: 362.

Komorowski L, Müller R, Vorobyev A, Probst C, Recke A, Jonkman MF, Hashimoto T, Kim SC, Groves R, Ludwig RJ, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E. (2013) Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol*, 68: e89-95.

Kumar V, Valeski JE, Chorzelski TP, Jablonska S. (1996) Significance of IgG-subclass antibody determinations in bullous pemphigoid. *J Clin Lab Anal*, 10: 432.

Lamb PM, Patton T, Deng JS. (2008) The predominance of IgG4 in prodromal bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*, 47: 150.

Lamb PM, Abell E, Tharp M, Frye R, Deng JS. (2006) Prodromal bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*, 45: 209–214.

Lehman JS, Camilleri MJ. (2013) Diagnostic utility of direct immunofluorescence findings around hair follicles and sweat glands in immunobullous disease. *J Cutan Pathol*, 40: 230-235.

Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest*, 92: 2480–2488.

Long Q, Zuo YG, Yang X, Gao TT, Liu J, Li Y. (2016) Clinical features and in vivo confocal microscopy assessment in 12 patients with ocular cicatricial pemphigoid. *Int J Ophthalmol*, 9: 730–737.

Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. (2013) Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 31: 391-399.

Mariotti F, Grosso F, Terracina M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F, Zambruno G, Mastrogiacomo A, Di Zenzo G. (2004) Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *Br J Dermatol*, 151: 1004-1010.

Marzano AV, Cozzani E, Fanoni D, De Pità O, Vassallo C, Berti E, Parodi A, Crosti C, Cugno M. (2013) Diagnosis and disease severity assessment of epidermolysis bullosa acquisita by ELISA for anti-type VII collagen autoantibodies: an Italian multicentre study. *Br J Dermatol*, 168: 80-84.

McGregor JM, Barker JN, Allen MH, MacDonald DM. (1991) Antigenic profile of human acrosyringium. *Br J Dermatol*, 125: 413-418.

Messingham KA, Noe MH, Chapman MA, Giudice GJ, Fairley JA. (2009) A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. *J Immunol Methods*, 346: 18–25.

Pohla-Gubo G, Lazarova Z, Giudice GJ, Liebert M, Grassegger A, Hintner H, Yancey KB. (1995) Diminished expression of the extracellular domain of bullous pemphigoid antigen 2 (BPAG2) in the epidermal basement membrane of patients with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 4: 199-206.

Provost TT, Tomasi TB Jr. Evidence for complement activation via the alternate pathway in skin diseases, I. (1973) Herpes gestationis, systemic lupus erythematosus, and bullous pemphigoid. *J Clin Invest*, 52: 1779-1787.

Rychlik-Sych M, Barańska M, Wojtczak A, Skrętkowicz J, Żebrowska A, Waszczykowska E. (2015) The impact of the CYP2D6 gene polymorphism on the risk of pemphigoid. *Int J Dermatol*, 54:1396–1401.

Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, Tron F, Joly P. (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, 147: 293-298.

Ruocco V, Sacerdoti G. (1991) Pemphigus and bullous pemphigoid due to drugs. *Int J Dermatol*, 30: 307–312.

Saleh MA, Ishii K, Kim YJ, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M. (2011) Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci*, 62: 169-175.

Sakuma-Oyama Y, Powell AM, Oyama N, Albert S, Bhogal BS, Black MM. (2004) Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*, 151: 126-131.

Sárdy M, Kostaki D, Varga R, Peris K, Ruzicka T. (2013) Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*, 69: 748-753.

Sävervall C, Sand FL, Thomsen SF. (2017) Pemphigoid gestationis: current perspectives. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 10: 441-419.

Schmidt E, Dährnich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Hashimoto T, Bröcker EB, Recke A, Rose C, Zillikens D. (2010) Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol*, 19: 458-463.

Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. (2000) Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, 136: 174–178.

Sharma VK, Prasad HR, Khandpur S, Kumar A. (2006) Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol*, 45: 518-522.

Shirakata Y, Shiraishi S, Sayama K, Miki Y. (1990) Subclass characteristics of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid and pemphigus. *J Dermatol*, 17: 661.

Soh H, Hosokawa H, Miyauchi H, Izumi H, Asada Y. (1991) The distribution of IgG subclass autoantibodies in bullous pemphigoid analysed by immunofluorescence and immunoblotting. *Arch Dermatol Res*, 283: 400.

Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D. (2007) Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol*, 16: 770-777.

Tampoia M, Lattanzi V, Zucano A, Villalta D, Filotico R, Fontana A, Vena GA, Di Serio F. (2009) Evaluation of a new ELISA assay for detection of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid. *Ann NY Acad Sci*, 1173: 15-20.

Terra JB, Jonkman MF, Diercks GF, Pas HH. (2013) Low sensitivity of type VII collagen enzyme-linked immunosorbent assay in epidermolysis bullosa acquisita: serration pattern analysis on skin biopsy is required for diagnosis. *Br J Dermatol*, 169: 164-167.

Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Schuler G, Borradori L, Hertl M. (2006) Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230. *J Immunol*, 176: 2015–2023.

Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, Treudler R, Zouboulis CC, Schuler G, Borradori L, Hertl M. (2004) BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 122: 1413-1422.

Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, Kikuchi T, Sato-Matsumura KC, Shimizu H. (2005) Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A

domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*, 37: 145–149.

Vassileva S. (1998) Drug-induced pemphigoid: bullous and cicatricial. *Clin Dermatol*, 16: 379–387.

Venning VA, Wojnarowska F. (1995) Induced bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*, 132: 831–832.

Walsh SR, Hogg D, Mydlarski PR. (2005) Bullous pemphigoid: from bench to bedside. *Drugs*, 65: 905–926.

Wenzel FG, Horn TD. (1998) Nonneoplastic disorders of the eccrine glands. *J Am Acad Dermatol*, 38: 1-17.

Witte M, Zillikens D, Schmidt E. (2018) Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases. *Front Med (Lausanne)*, 5: 296.

Yamada H, Hashimoto T, Nishikawa T. (1989) IgG subclasses of intercellular and basement membrane zone antibodies: the relationship to the capability of complement fixation. *J Invest Dermatol*, 92: 585.

Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T. (2006) Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*, 41: 21-30.

Zhao HL, Chen Y, Zhao HJ, Tan ZJ, Zhang CP, Fu XB, Ma K. (2016) Autofluorescence of eccrine sweat glands. *Skin Res Technol*, 22: 98-103.

Zheng M, Ujiie H, Iwata H, Muramatsu K, Yoshimoto N, Ito T, Ujiie I, Shimizu S, Sato-Matsumura KC, Shimizu H. (2019) Characteristics of IgG subclasses and complement deposition in BP230-type bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 33: 595-600.

Zhou S, Wakelin SH, Allen J, Wojnarowska F. (1998) Blister fluid for the diagnosis of subepidermal immunobullous diseases: a comparative study of basement membrane zone autoantibodies detected in blister fluid and serum. *Br J Dermatol*, 139: 27.

Zhou C, Yu Y, Elston DM. (2016) Diagnostic value of eccrine glands and hair follicles in direct immunofluorescent analysis of pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *J Cutan Pathol*, 43: 334-338.

Zuo Y, Evangelista F, Culton D, Guilabert A, Lin L, Li N, Diaz L, Liu Z. (2016) IgG4 autoantibodies are inhibitory in the autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Autoimmun*, 73: 111–119.

Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ. (1997) A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 109: 679-683.

A dolgozatban felhasznált DIF-képek a szerző ill. Prof. Sárdy Miklós saját felvételei, az klinikai képeket pedig a Ludwig-Maximilian Egyetem Bőrgyógyászati Klinika, Fotólabor munkatársai készítették.

X. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Horváth ON**, Varga R, Kaneda M, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. (2016) Diagnostic performance of the "MESACUP anti-Skin profile TEST". *Eur J Dermatol*, 26: 56-63.
2. Jankásková J, **Horváth ON**, Varga R, Ruzicka T, Sárdy M. (2016) Complement Fixation Test: An Update of an Old Method for Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*, 96: 197-201.
3. Jankásková J, **Horváth ON**, Varga R, Arenberger P, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. (2018) Increased sensitivity and high specificity of indirect immunofluorescence in detecting IgG subclasses for diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*, 43: 248-253.
4. Sinem Bağcı I, **Horváth ON**, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. (2017) Diagnostic Value of Linear Fluorescence Along the Basement Membrane of Sweat Gland Ducts in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*, 97: 622-626.

Egyéb közlemények:

1. **Horváth ON**, Jankásková J, Walker A, Sárdy M. (2015) Pemphigoid diseases. *Autoimmune diseases in the elderly. Hautarzt*, 66: 583-588.
2. **Horváth ON**, Kapser C, Sárdy M. (2016) Inflammatory diseases of oral mucous membranes. *Hautarzt*, 67: 786-792.
3. **Horváth ON**, Borovaya A, Roider E, Kloze J, Hartlieb E, Waschke J, Ruzicka T, Sárdy M. (2015) Successful methotrexate treatment of oesophageal pemphigus vulgaris in an immunosuppressed patient with Crohn's disease. *Acta Derm Venereol*, 95: 868-869.
4. **N Horváth O**, Letulé V, Ruzicka T, Herzinger T, Goldscheider I, von Braunmühl T. (2017) Periocular discoloration after using a prostaglandin analog for eyelash enhancement: evaluation with reflectance confocal microscopy. *J Cosmet Dermatol*, 16: 18-20.
5. **Horváth ON**, von Braunmühl T, Sárdy M. (2018) Pediatric linear IgA/IgG dermatosis. *Hautarzt*, 69: 28-30.

6. Bağcı IS, **Horváth ON**, Ruzicka T, Sárdy M. (2017) Bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev*, 16: 445-455.
7. Sárdy M, Borovaya A, **Horváth ON**, Folwaczny C, Schmitt W, Schmidt T, Hertl M, Ruzicka T. (2016) Successful rituximab treatment of juvenile bullous pemphigoid with esophageal scarring due to epitope spreading. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14: 618-621.
8. Bağcı IS, Ruini C, Niesert AC, **Horváth ON**, Berking C, Ruzicka T, von Braunmühl T. (2018) Effects of Short-Term Moisturizer Application in Different Ethnic Skin Types: Noninvasive Assessment with Optical Coherence Tomography and Reflectance Confocal Microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*, 31: 125-133.
9. Walter E, Vielmuth F, Rotkopf L, Sárdy M, **Horváth ON**, Goebeler M, Schmidt E, Eming R, Hertl M, Spindler V, Waschke J. (2017) Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. *Sci Rep*, 7: 3579.

XI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Sárdy Miklósnak a PhD tanulmányaim alatt nyújtott folyamatos támogatását. Az ő óriási tapasztalata és útmutatásai segítettek abban, hogy egy számomra teljesen ismeretlen témát néhány év alatt nagyon mélyen elsajátítottam, eljutottam a szakvizsgáig és a PhD munka megírásáig. Sárdy prof. úr hihetetlen szakmai tudással kezelte a betegeket és ennek átadását soha nem tekintette tehernek. Naptól és napszaktól függetlenül fordulhattam hozzá a komoly kérdésektől az apróságokig bármivel.

Kösznettel tartozom Dr. Purebl Györgynek, másik témavezetőmnek, aki először bátorított a PhD képzésre jelentkezésre, s az éveken át szakmai segítsége mellett panasz nélkül vállalta a bürokráciával járó nehézségeket is. Köszönöm témavezetői és emberi segítségét, nagy öröm az ő vezetésével is elmerülni a kutatás szépségeiben.

Köszönettel tartozom férjemnek, Dr. Papp Gergelynek, szüleimnek és a tágabb családomnak is. Külön köszönöm az öcsémnek, Horváth Ákosnak a segítségét a lakhatás terén, illetve a szemléleti iránymutatást.

Köszönöm a Ludwig-Maximilian Egyetem és Semmelweis Egyetem Bőrgyógyászati Klinikája minden munkatársának, hogy segítségemre voltak/vannak a munkám során.

Köszönöm Prof. Thomas Ruzickának, hogy lehetőséget adott a müncheni kutatómunka megkezdésére, majd részvételre a klinikai munkában. Nagyon tanulságos volt az együtt töltött idő.

Köszönöm Prof. Lars Frenchnek a folyamatos támogatását.

Köszönöm Ivica Anicnak, Andrea Albrechtnek és Karin Woischwillnak a labordiagnosztikában és klinikai munkában nyújtott segítséget.

Köszönöm Carla Lingner, Diana Lingk és Claudia Jakobec segítségét a klinikai fotók elkészítésében.

Köszönöm Prof. Andreas Wollenbergnek támogatását és az értékes közös konzultációkat. Köszönöm Dr. Markus Reinholznak a közös munka során nyújtott folyamatos emberi és szakmai segítségét.

Köszönöm kutatótársaimnak, Dr. Jana Jankaskovának és Dr. Sinem Bagcinak a folyamatos kooperációt és az együtt eltöltött vidám éveket.

Végezetül köszönöm Dr. Michael Flaig segítségét, hogy Münchenben írhattam a PhD dolgozatomat és megkezdhettem a rezidensképzést.