



Autoimmundiagnostik

Ein Übersicht

Zsuzsanna Beleznay

Institut für Labormedizin

beleznay.zsuzsanna@med.semmelweis-univ.hu

Immunität

- Unterscheiden zwischen selbst und fremd



- ~~• Selbsttoleranz~~

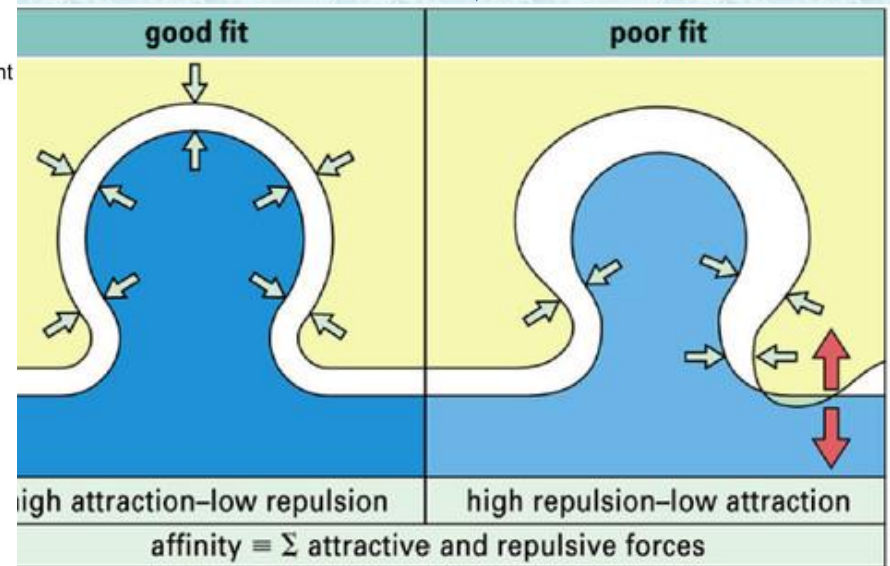
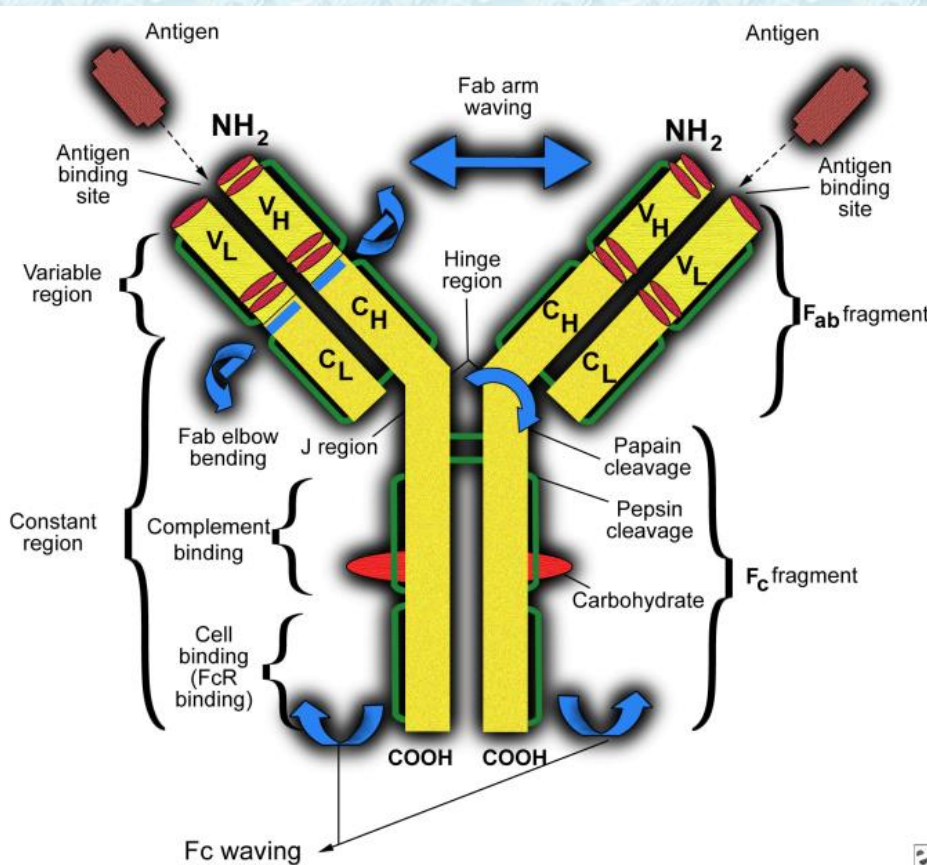
Autoimmunität

Diagnose: Antigen-Autoantikörper Komplex

Affinität – Avidität

Schlüssel-Schloß-Prinzip

Antikörper an sein Epitop → Affinität



Die **nichtkovalenten** Kräfte halten das Antigen – Antikörper zusammen.

niedrige Affinität

↓
Eine Kreuzreaktion mit anderen Antigen-Epitope ist möglich.

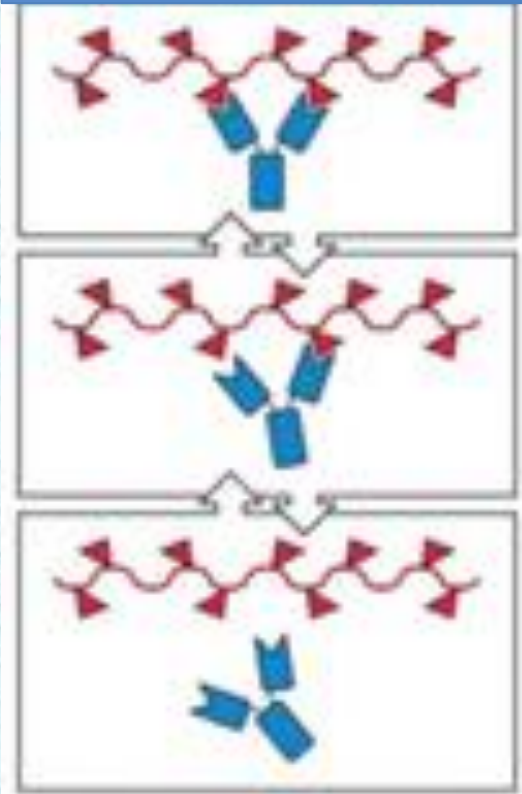
Monovalent Bindungskraft (intrinsic Affinität)

Affinität

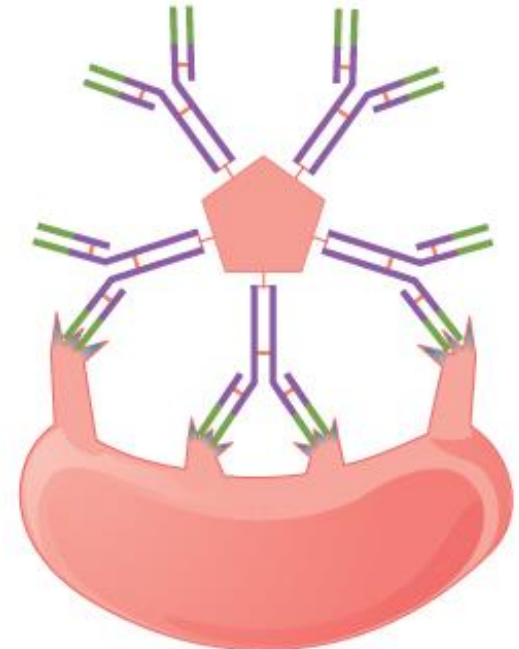
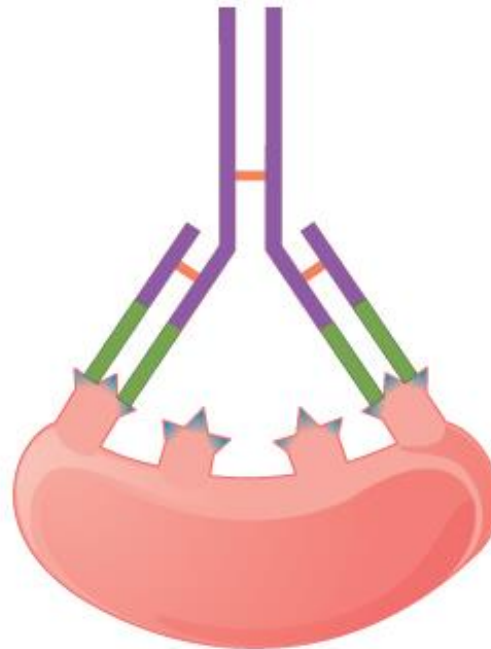


Multivalent Bindungskraft
(funktionelle Affinität)
höher als die Summe der *Affinitäten*

Avidität



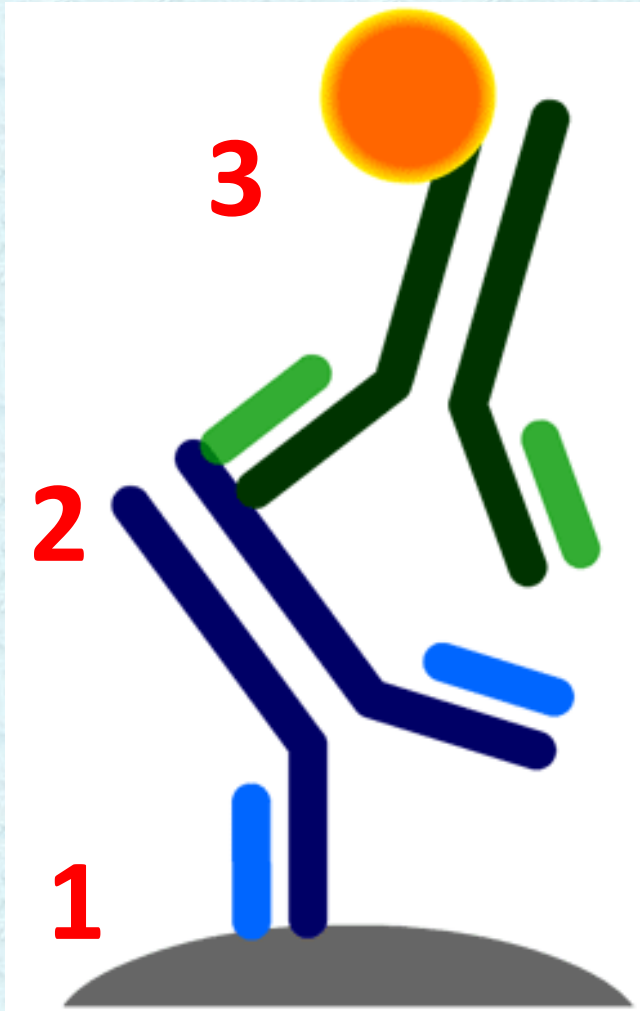
Affinität vs. Avidität



Die **Avidität** zwischen einem monovalenten Antigen und einem bivalenten Antikörper ist somit identisch mit der **Affinität**.

IgM selbst hat niedrige **Affinität**, aber zehn Antigen-bindungsstelle ergibt eine **hohe Avidität**.

Prinzip der Autoantikörper-Bestimmung



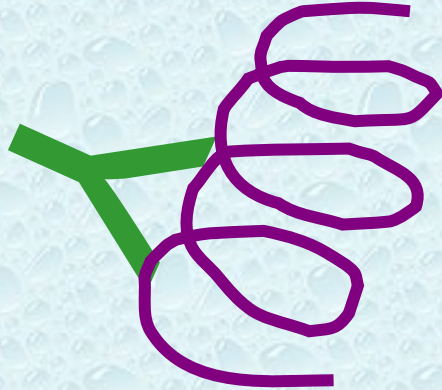
1. In der Fest- oder Flüssigkeitsphase sind potenzielle Antigene
2. Untersuchende *primäre Autoantikörper* – vorverdünnte Patientenserum
3. Visualisierung der vorhandenen Antigen-Autoantikörper Komplexe - *Sekundäre Antikörper*- Anti-Human- Immunglobulin

Markierung ist abhängig von des Testverfahrens

Immunologische Methoden

Immunopräzipitation

*Farr-Assay
mit Ammoniumsulfat
Präzipitation*

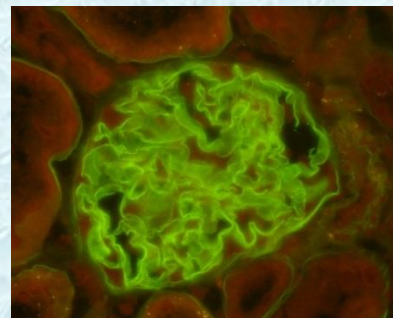


Konformationsepitope

ELISA



Indirekt
Immunfluoreszenz



Blot

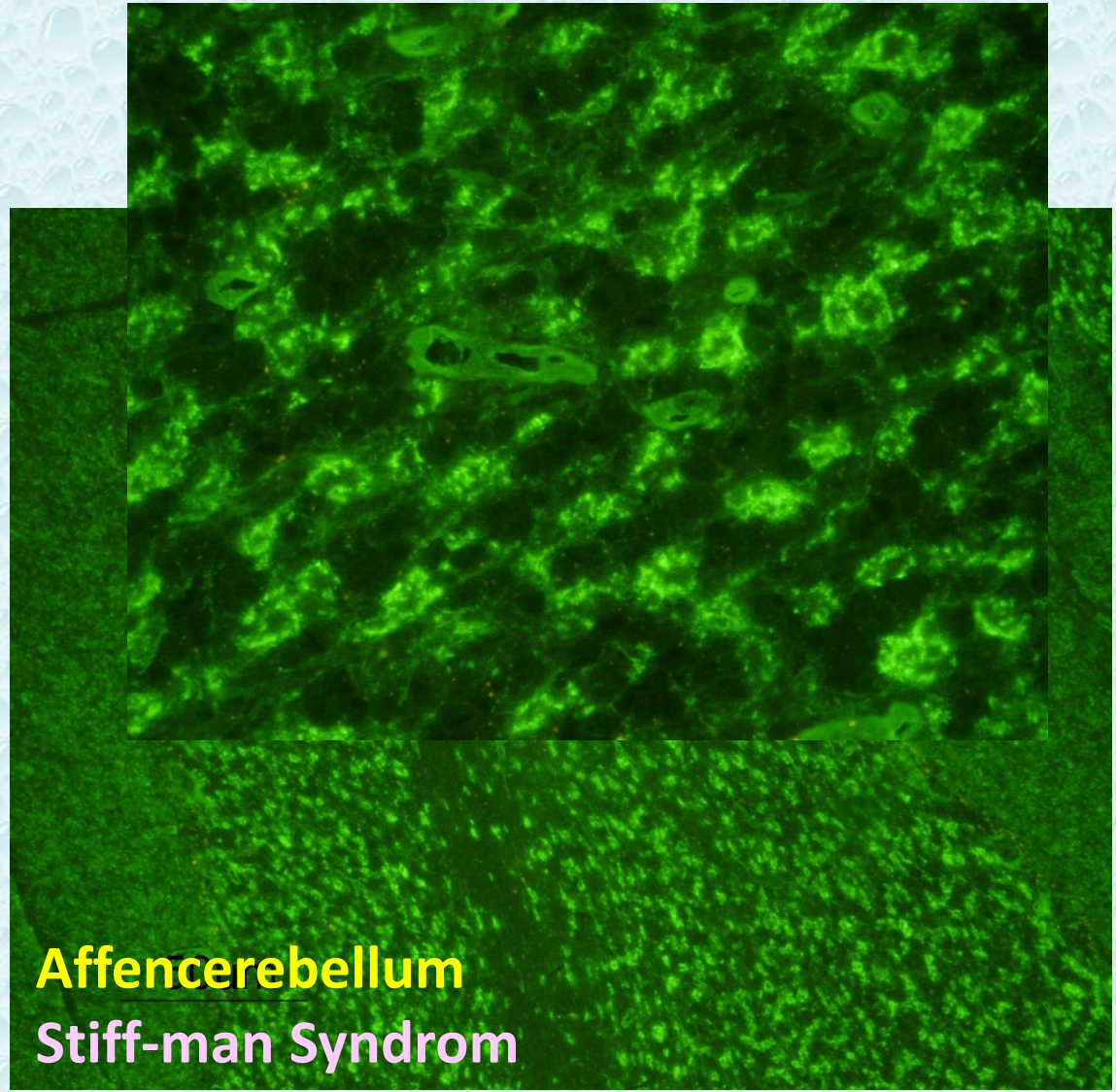
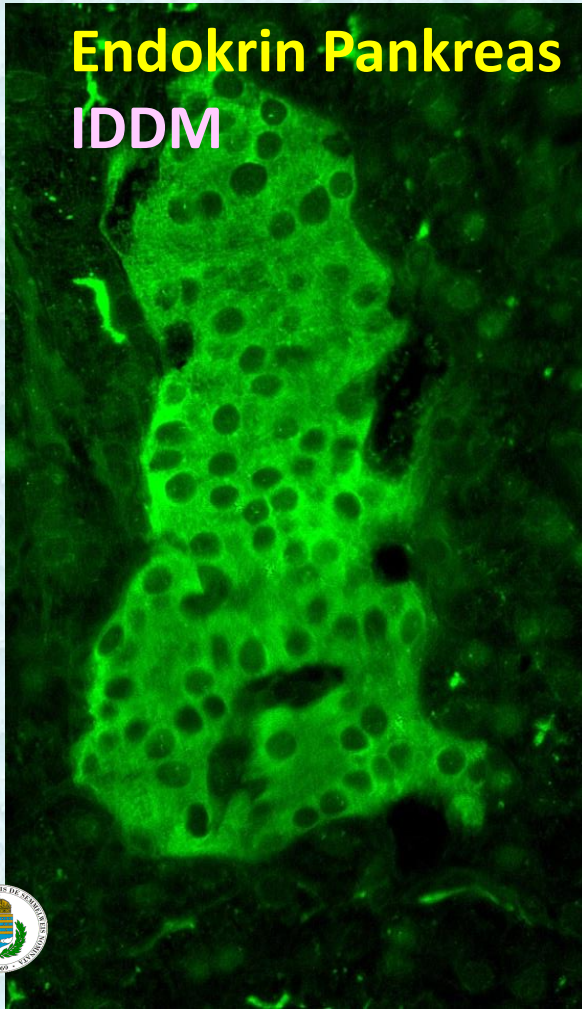


lineare Epitope

Radioimmunoassay

Gleicher Antigen – unterschiedliches Krankheitsbild

Endokrin Pankreas
IDDM

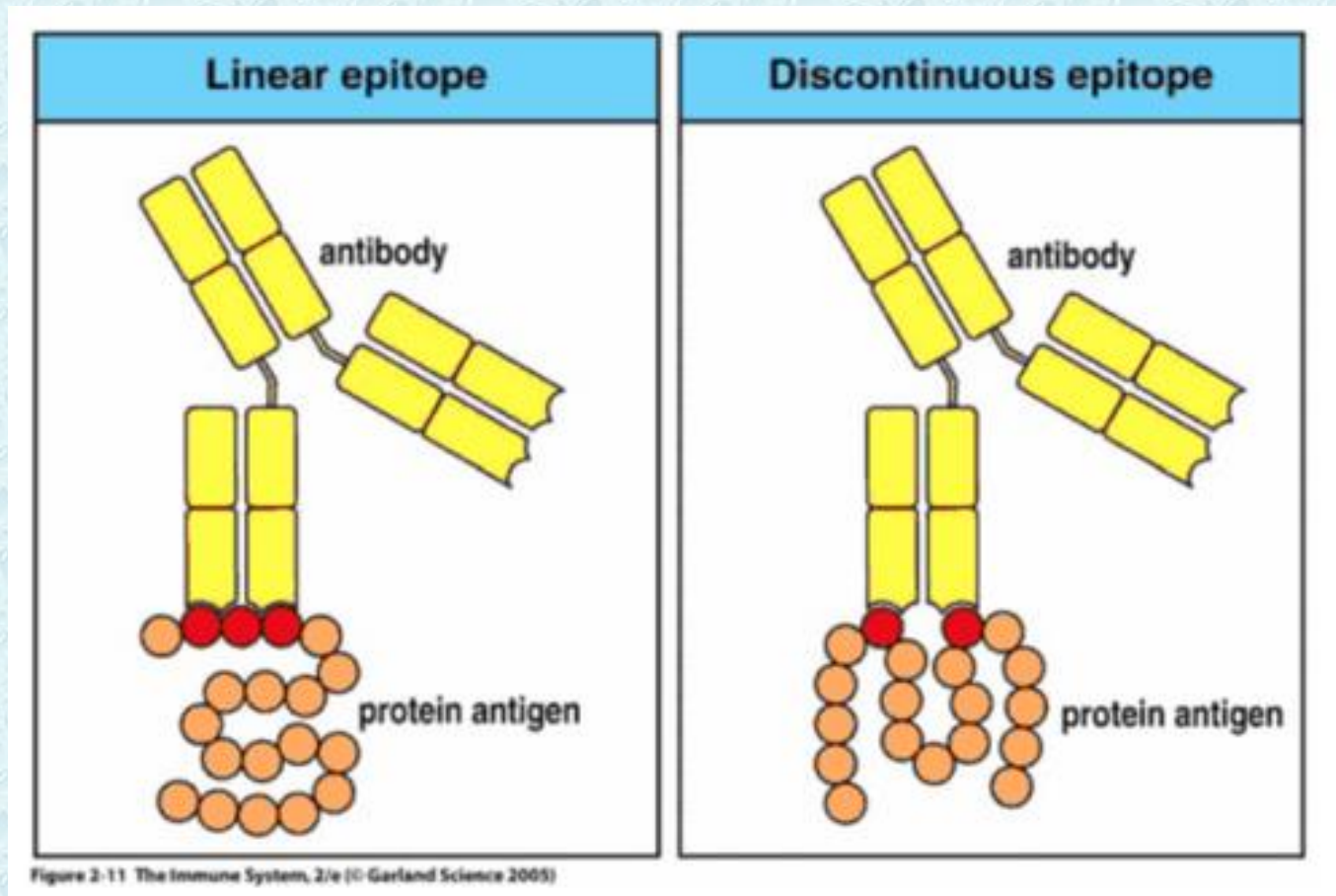


Affencerebellum
Stiff-man Syndrom

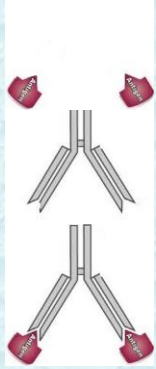
Keine Kreuzreaktion

- **Autoantigen:** Glutamatdecarboxylase (**GAD**)
- **Insulin-abhängige Diabetes Mellitus**
 - GAD 67kDa **Konformationsepitope**
Radioimmunassay
- **Stiff-Person-Syndrome** (*ist eine autoimmun-entzündliche Erkrankung des ZNS mit einer generalisierten Tonuserhöhung der Muskulatur*) - GAD 65 kDa
lineare Epitope
Immunoblot-Analyse

Lineare Epitope vs. Konformationsepitope



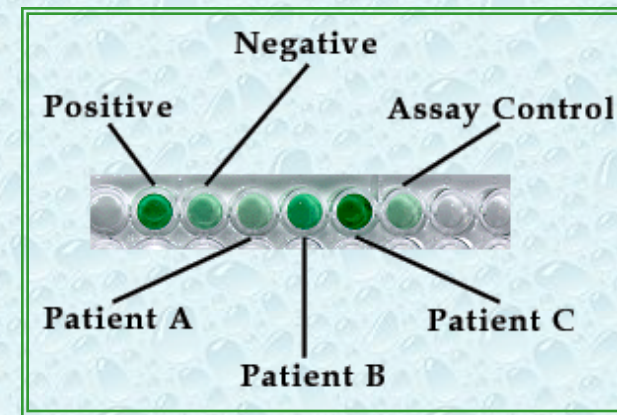
Das Testverfahren sind unterschiedlich: Immunoblot bzw. Radioimmunassay



Antigen
Autoantikörper vom Patientenserum

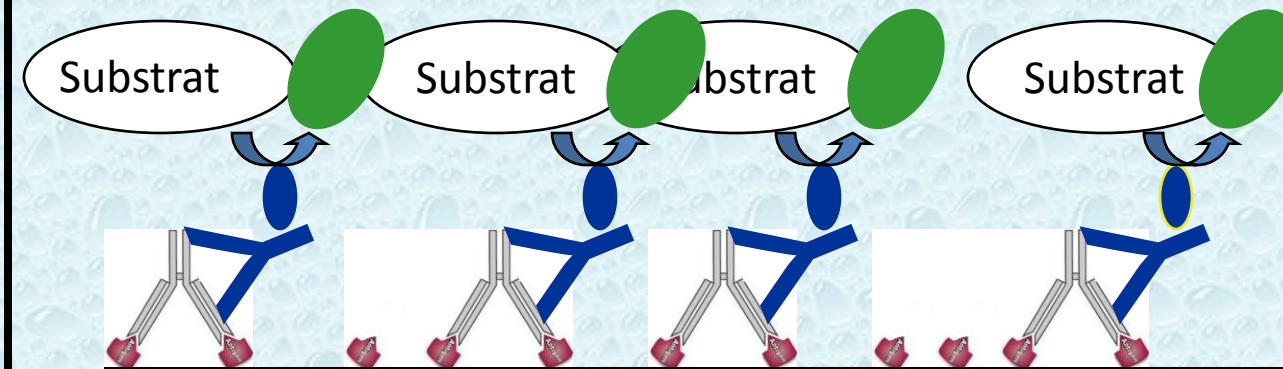
Antigen-Autoantikörper Komplex

Enzym-markierter antihuman Antikörper



ELISA

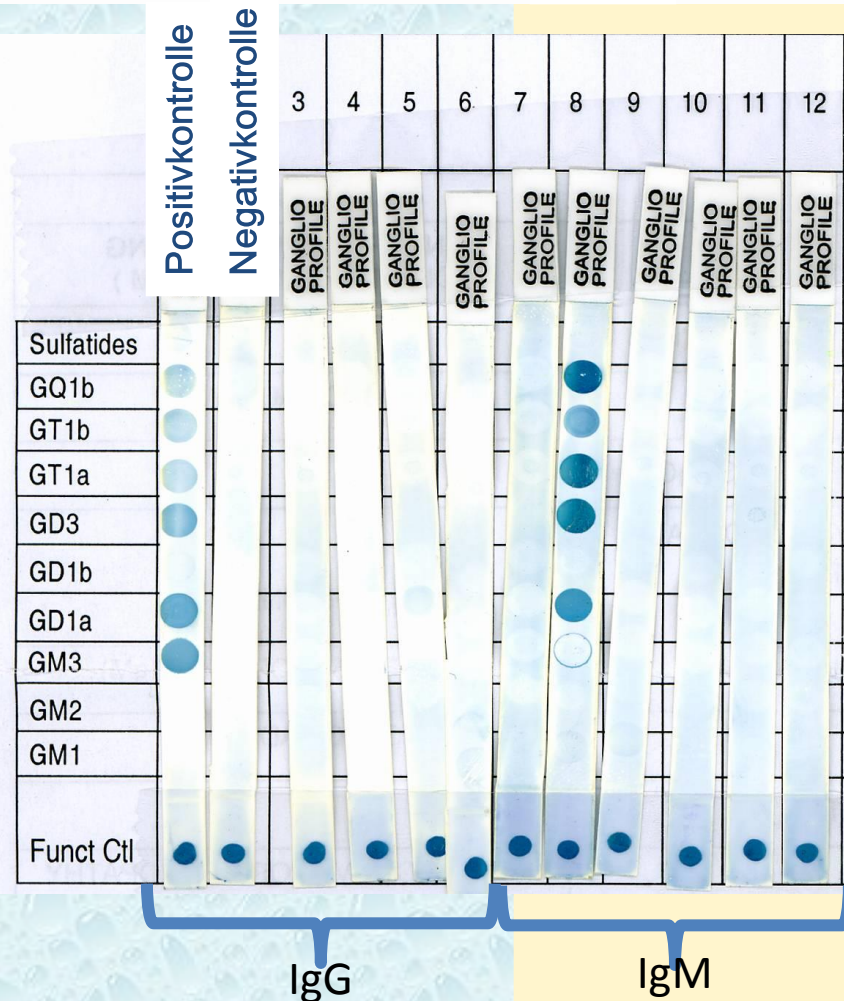
enzyme linked immunosorbent assay



ALPHADIA S.A. / N.V.
DIAGNOSTIC PRODUCTS

DOTZEN® Gangliosides Profile Ab

	Reaction Control	Nucleosome	Sm	Sm/RNP	SSA	SSB	Jo-1	Scl-70	Cut - Off
9 Nucleosome + ENA	●	●						●	●
10 Nucleosome + ENA	●	●		●	●				●
11 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●	●		●	●
12 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●				●
13 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●		●	●	●
14 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●	●	●	●	●
15 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●	●			●
16 Nucleosome + ENA	●	●	●	●	●			●	●
17 Nucleosome + ENA	●	●		●	●			●	●



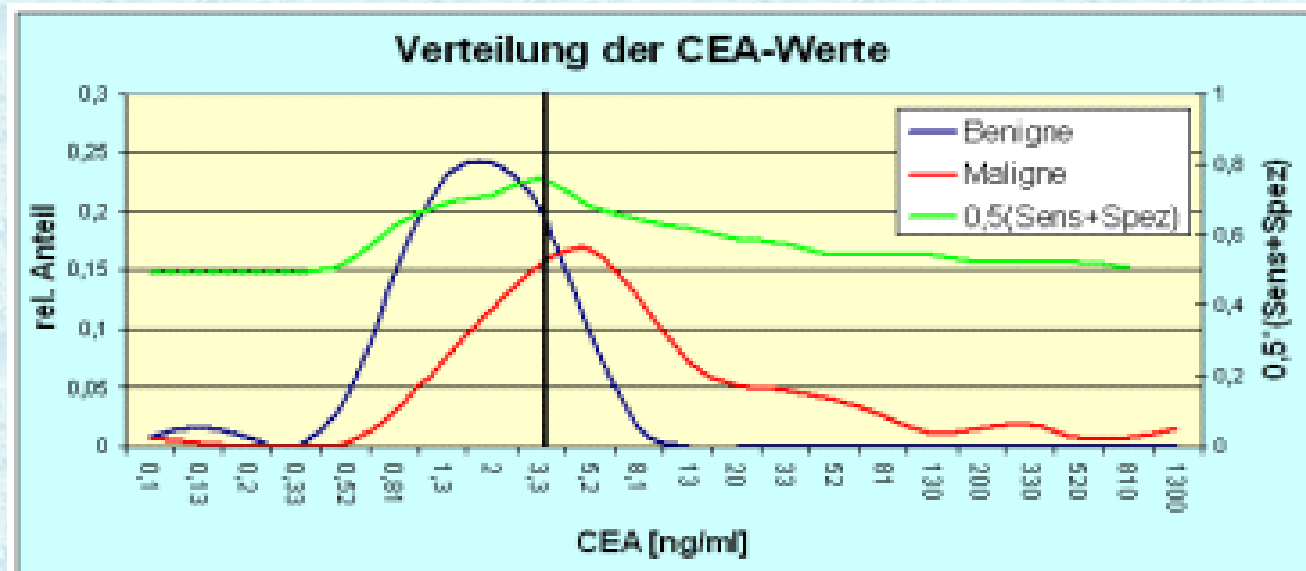
Serum

Western blot analysis of IgG and IgM antibodies against GP1 and GP2 of Hantaan virus. The IgG blot shows a positive result for GP1 (27-25) and a negative result for GP2 (25-33). The IgM blot shows a positive result for GP1 (62-65) and a negative result for GP2 (33-41). The GP1 bands are circled in pink.

IgG	GP 1 / 29-06		CSF
IgM	GP 1 / 9-50		CSF
IgG	GP 1 / 29-07		
IgM	GP 1 / 9-51		

Monospezifisches Kit

- Cut-off Wert von der Firma definiert



- Gereinigte oder rekombinante Antigene?

Maßzahlen für die Güte eines diagnostischen Tests:

Sensitivität = Wahrscheinlichkeit, dass Test bei kranken Personen positiv ausfällt **kein falsch negativ**

Spezifität = Wahrscheinlichkeit, dass Test bei gesunden Personen negativ ausfällt **kein falsch positiv**

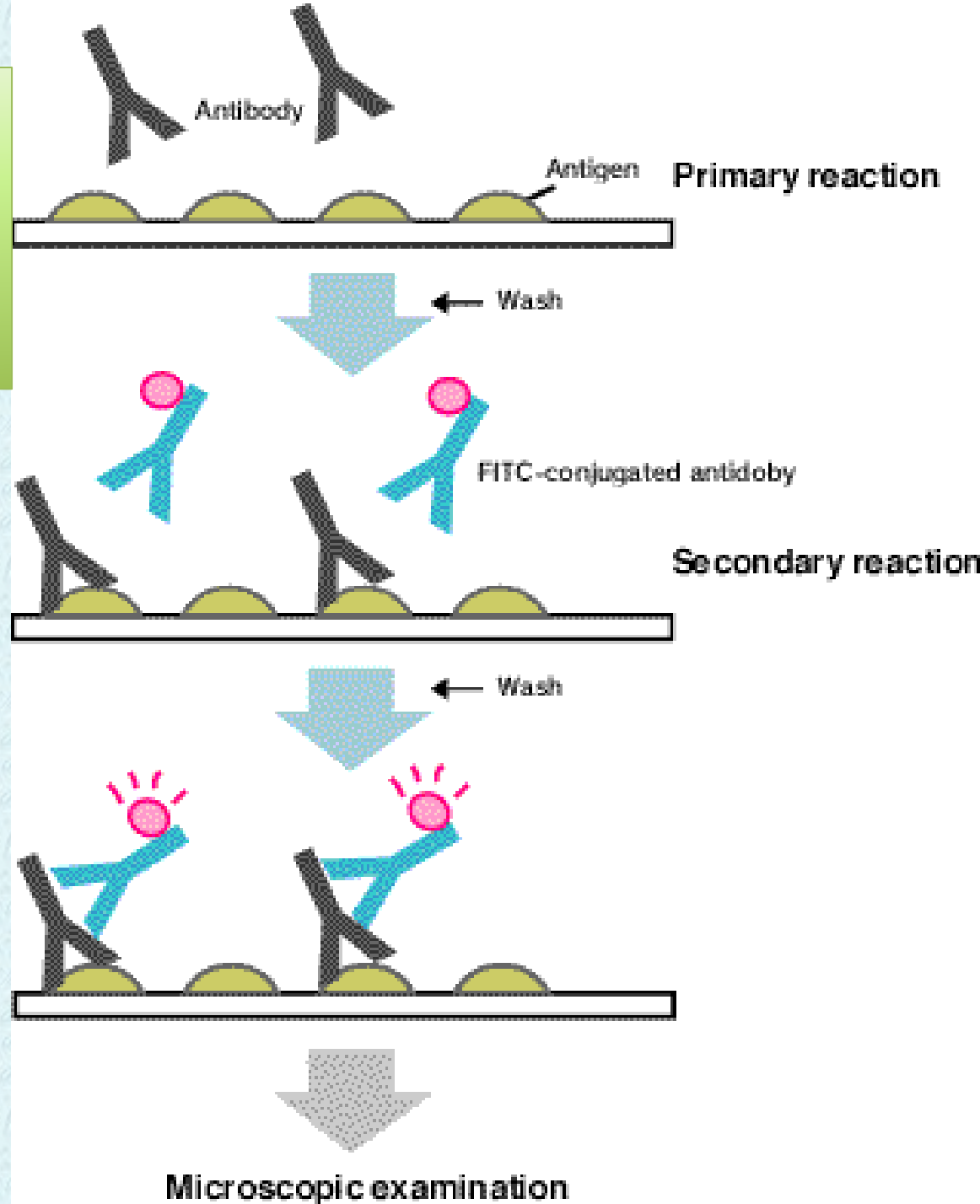
	Tatsächlicher Sachverhalt		
	krank	gesund	
Positiver Befund	A richtig positiv	B falsch positiv	Sensitivität = $A / (A+C)$
Negativer Befund	C falsch negativ	D richtig negativ	
Insgesamt	A + C	B + D	Spezifität = $D / (B+D)$

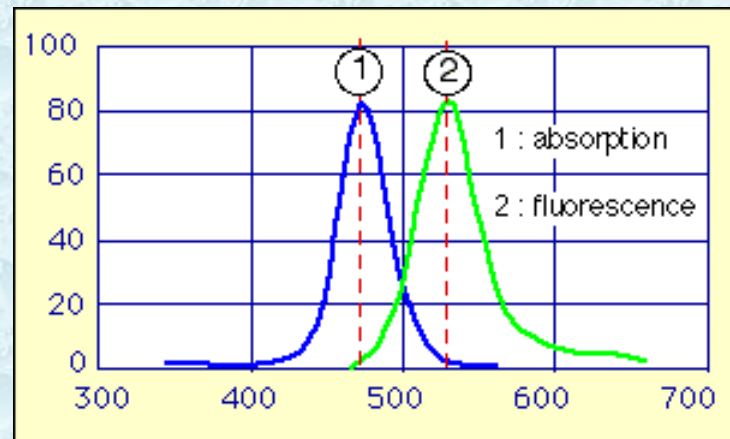
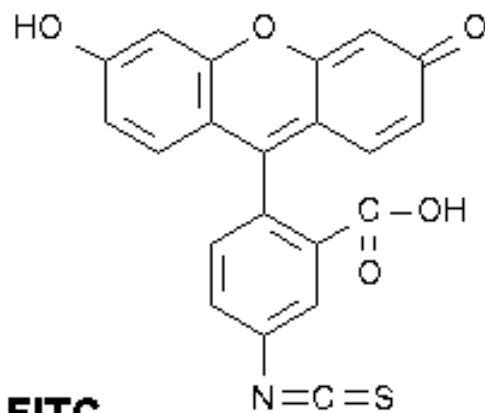
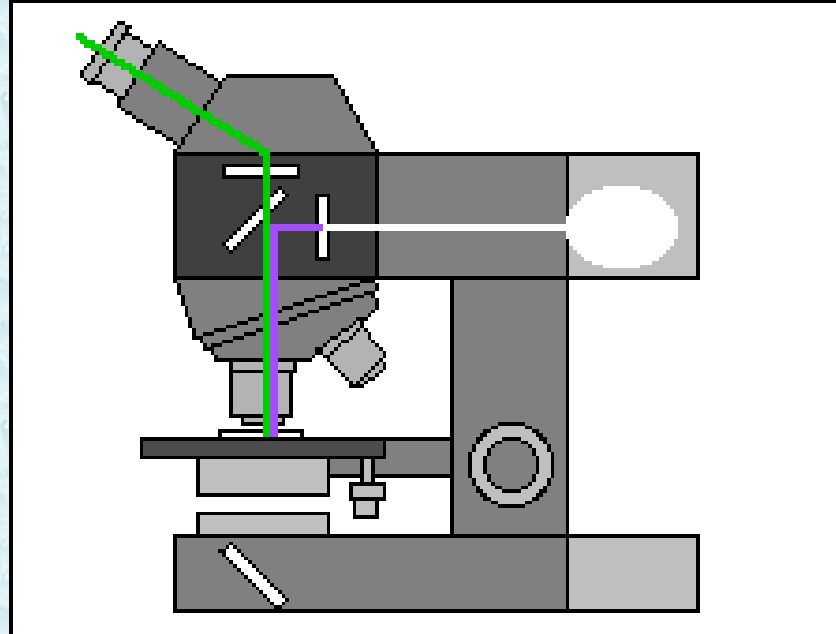
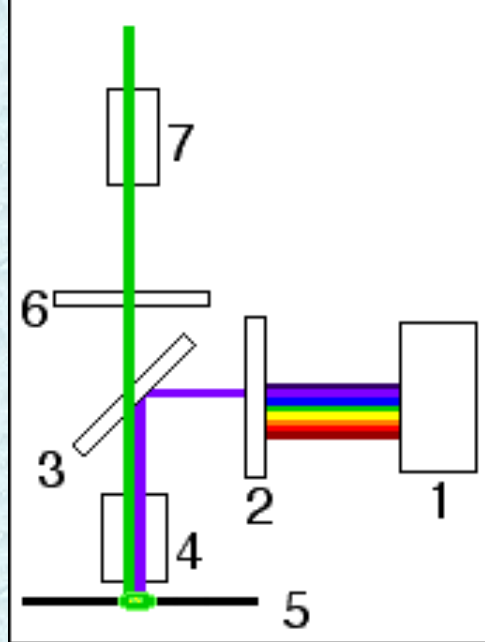
Allgemeine Screening-Methode: Indirekte Immunfluoreszenz



Substrat:

- Zellen
- Gewebe
(organspezifisch)





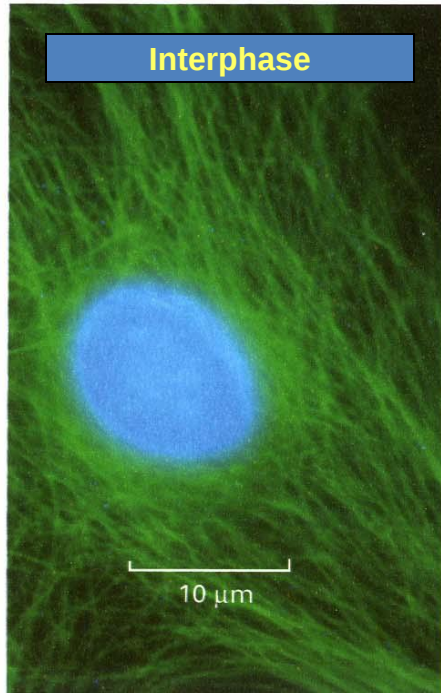
kurzwelliges Licht absorbiert - langwelliges emittiert

50um

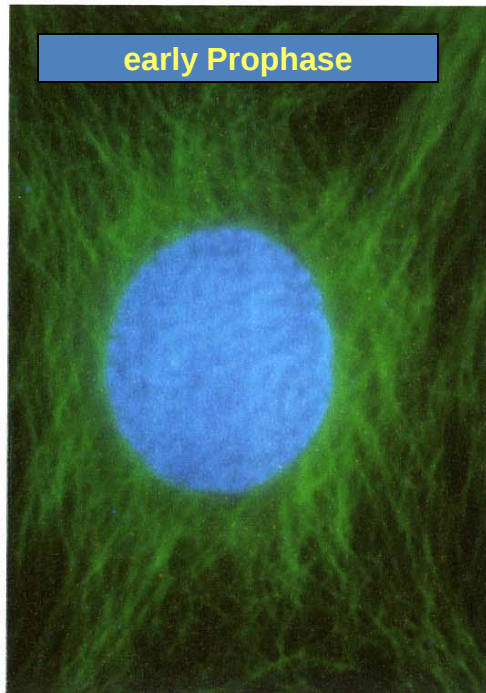
Antinukleäre Autoantikörper auf Hep-2 Zellen

- Fluoreszenzstärke im Zellkern $\Rightarrow$ Titration
- Muster im Zellkern (ANA –Antikörper)
- Mitose in der Metaphase
- Muster im Zytoplasma (*Zusatzinformation*)
- (Beurteilung von 2 Personen)

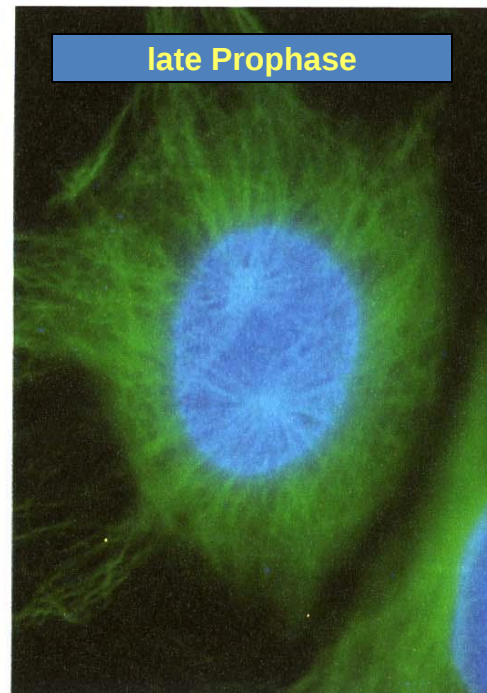
Interphase



early Prophase



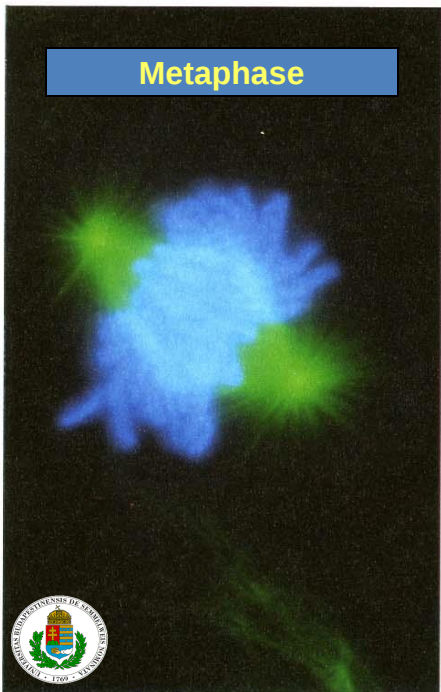
late Prophase



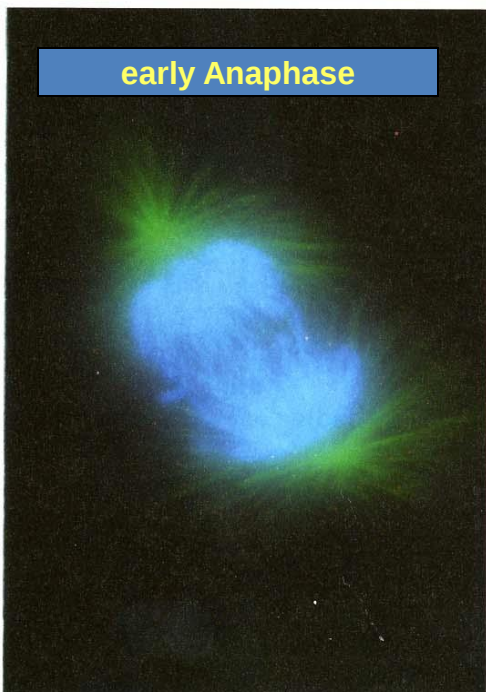
Prometaphase



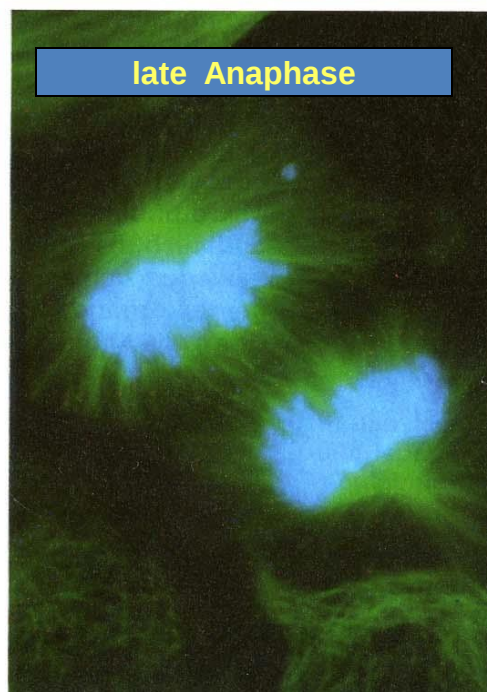
Metaphase



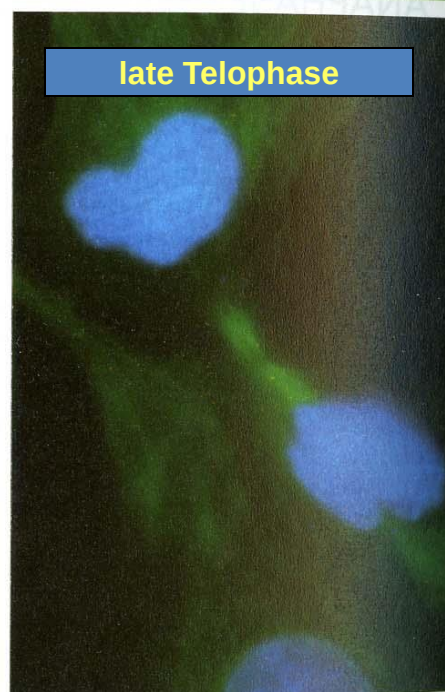
early Anaphase



late Anaphase



late Telophase



HEp-2

Metaphase

Telophase

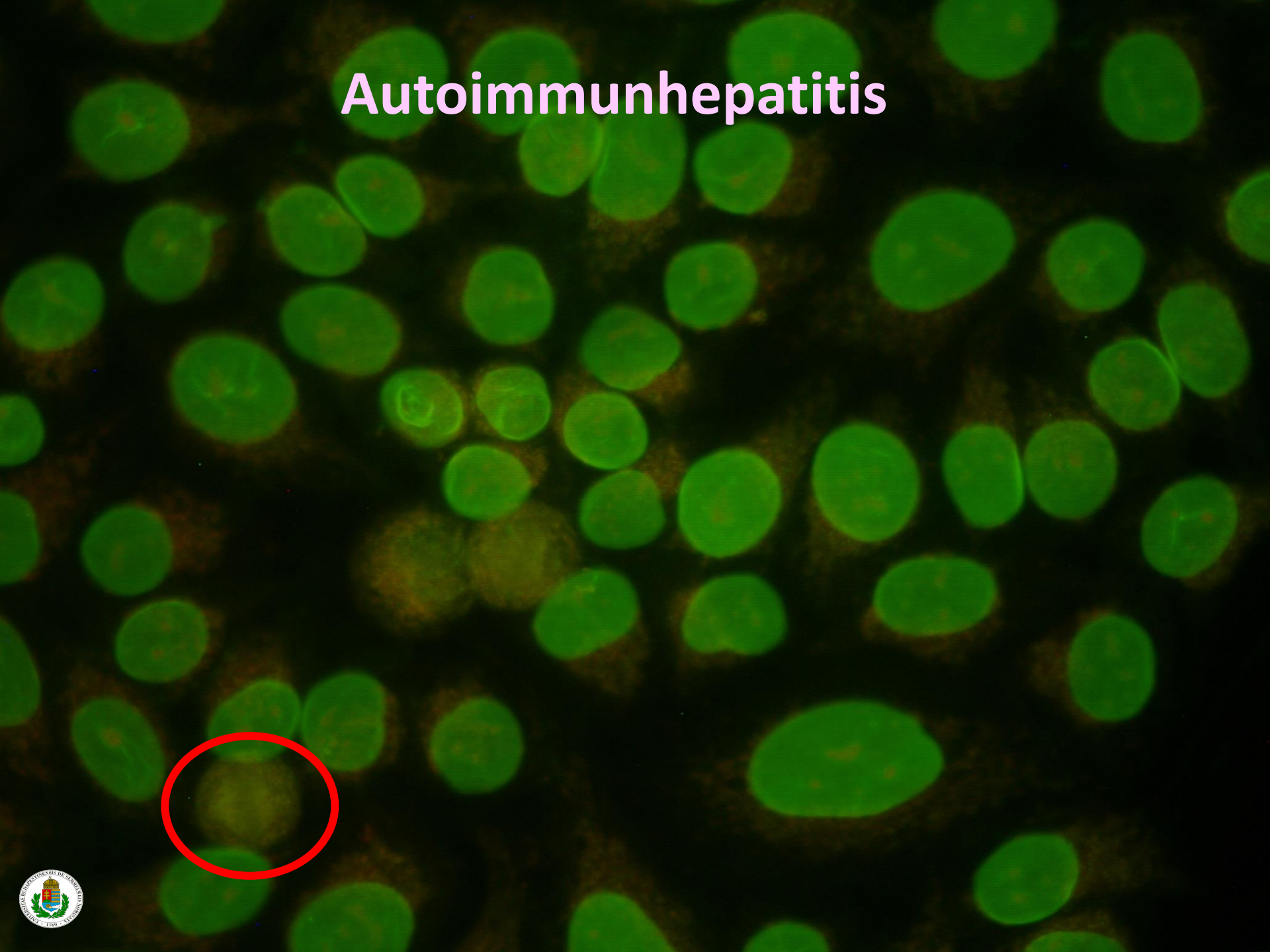
Interphase

Prophase



Systemisches lupus erythematosus (SLE)

Autoimmunhepatitis



Proliferation assoziierte Antigene

Patienten mit *Neoplasien* können Autoantikörper gegen solchen Antigene generieren, die in der Regulation des *Zellzyklus* oder in der *Mitose* selbst eine Rolle spielen.

PCNA

proliferating cell nuclear antigen

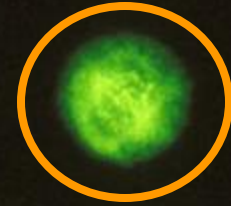
SLE



Pleomorph Muster ohne Mitose



Centromer -F

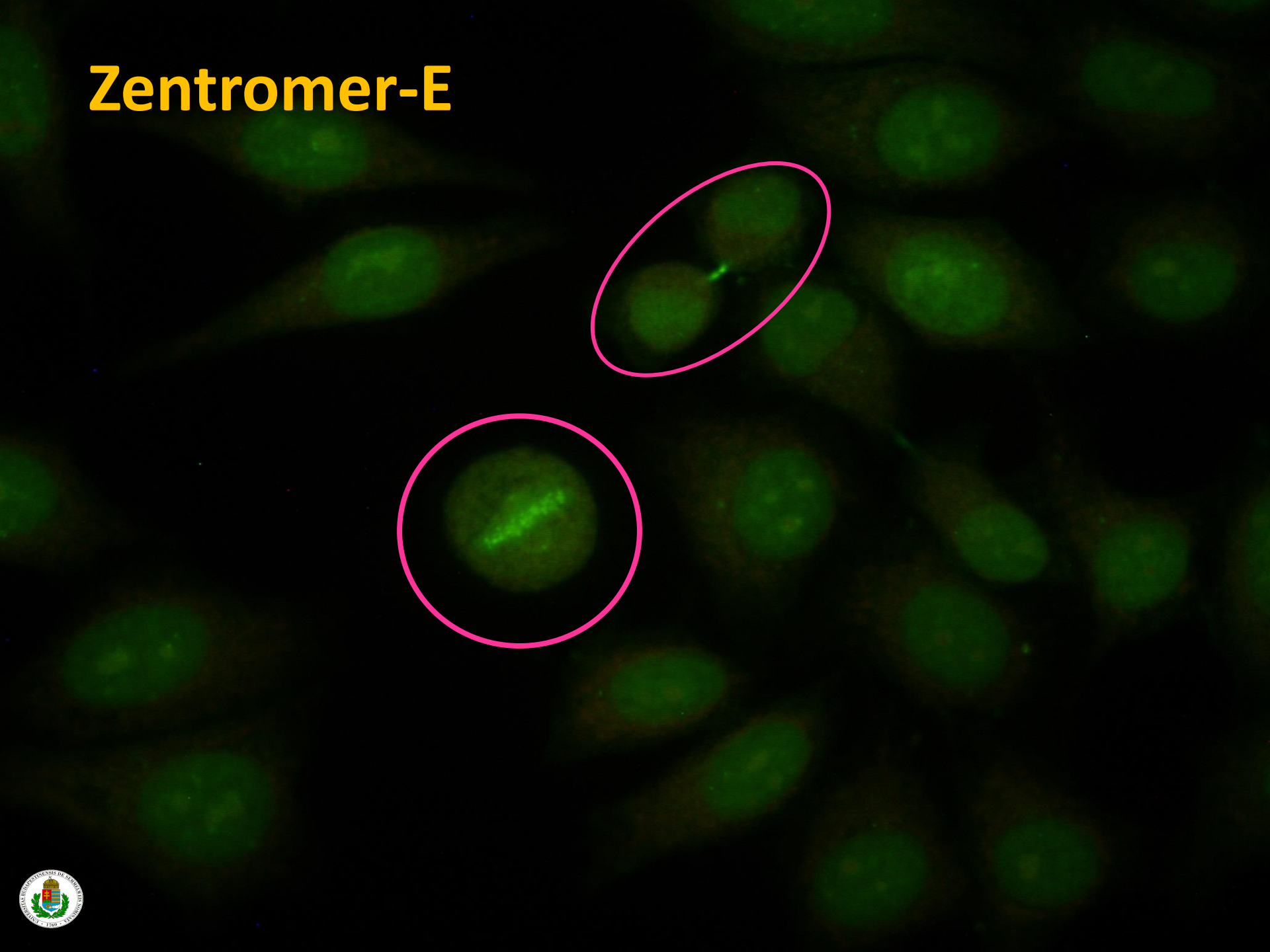


Neoplasie

Pleomorph Muster mit positiver Mitose



Zentromer-E



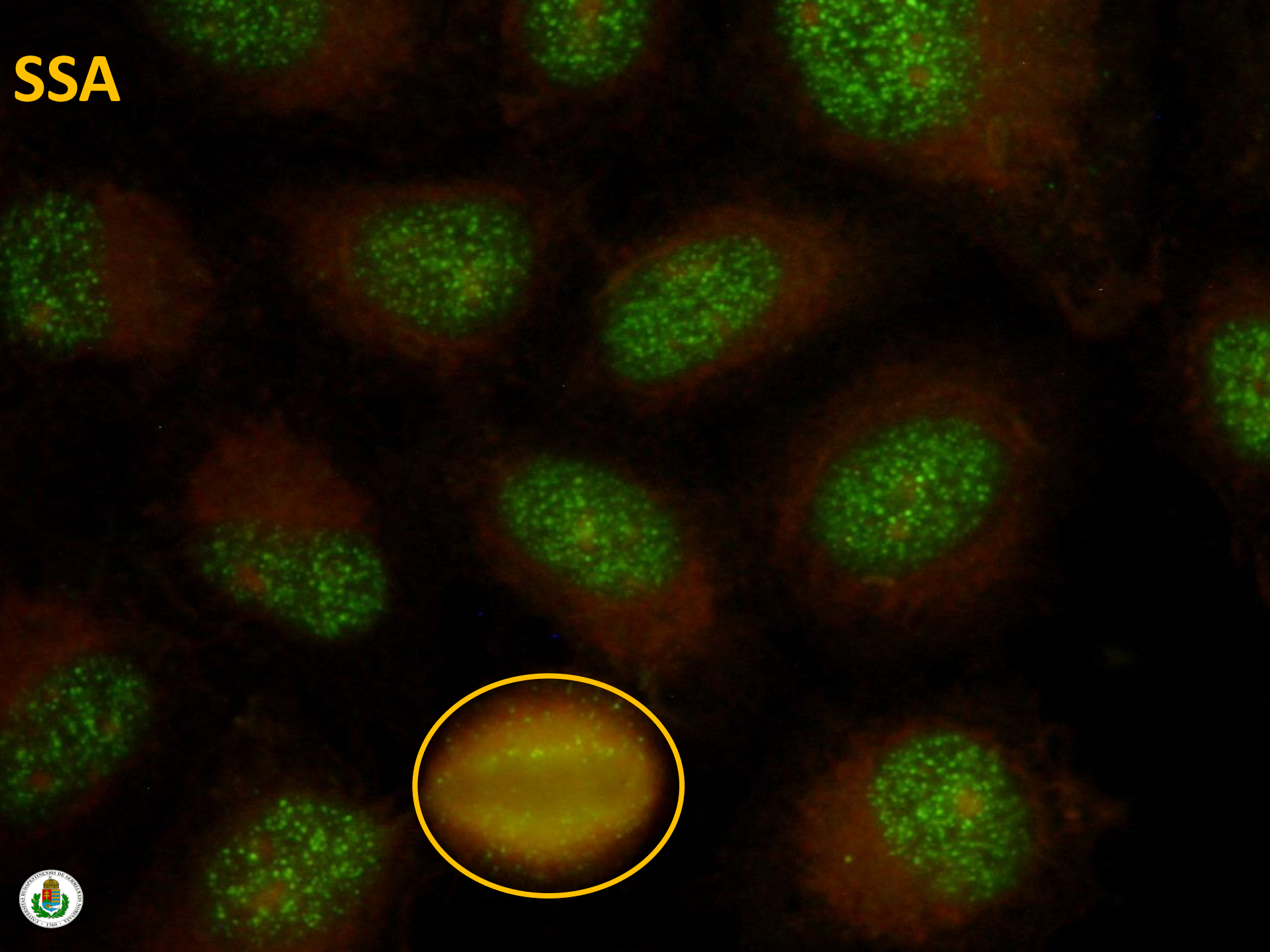
ENA ist eine Untergruppe des ANA

extractable **n**uclear **a**ntigen

extrahierbare Kernanteile mit einer hohen Salzkonzentration

- 1961 **SSA/Ro** (60 kDa) - *SLE, Sjögren-Syndrom*
- 1961 **SSB/La** – *Lupus bei Neugeborenen, Sjögren-Syndrom*
- 1966 **Sm**(ith Stephanie) - *SLE*
- 1970's **RNP** (Ribonukleoproteine) – *Mischkollagenose (MCTD)*
- 1979 **Scl-70** – *Sklerodermie*
- 1980 **Jo(e)-1** – *Dermato-Polymyositis*

SSA

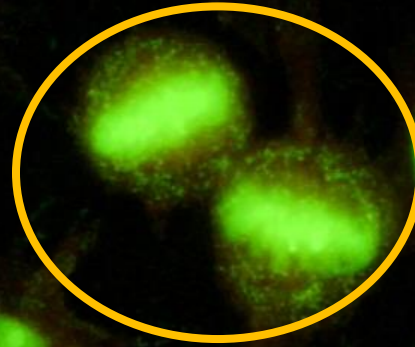


SSB

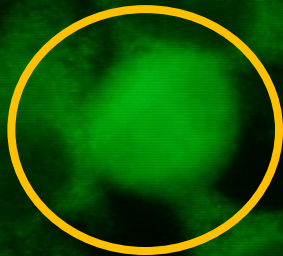


RNP/Sm

ScL-70



Jo-1



50um

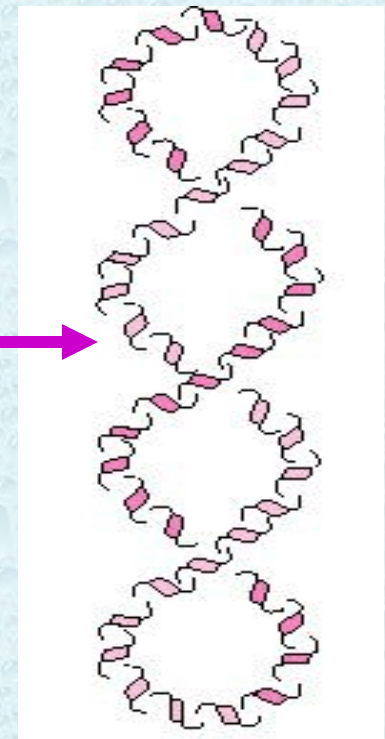
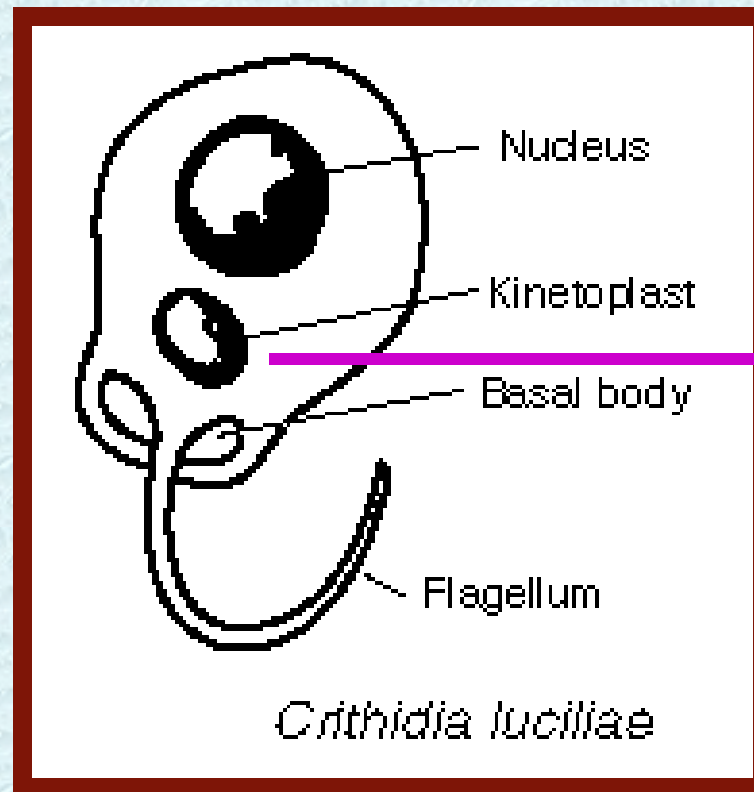
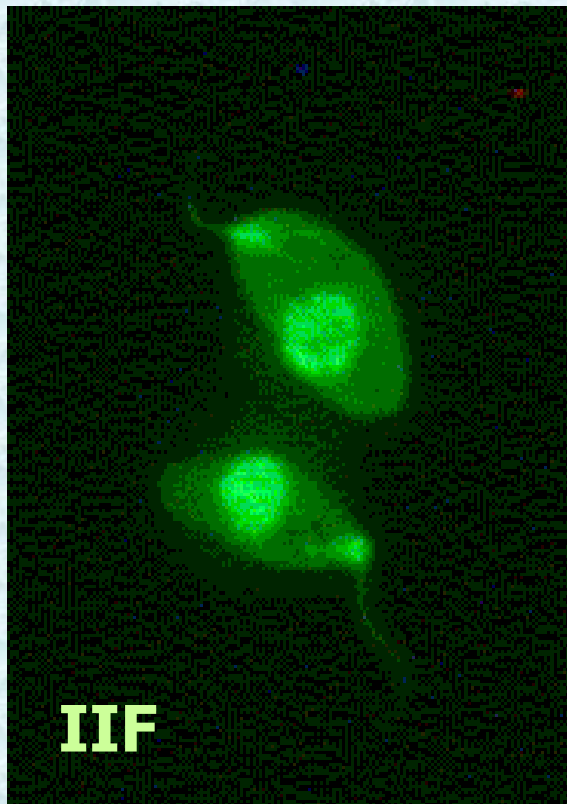


Anti-dsDNA – ist kein
ENA

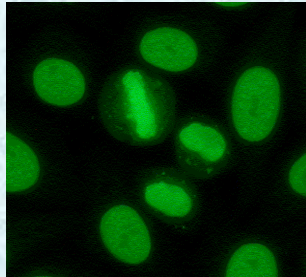
anti-Doppelstrang DNS (dsDNS)

- **SLE**
- **Drug-induziertes SLE (anti-Histon)**
- **Autoimmunhepatitis Typ I**
- **Juvenile Idiopathische Arthritis**

Crithidia luciliae



Verschiedene Screening Methoden für dsDNS bei SLE Patienten



HEp-2
IIF

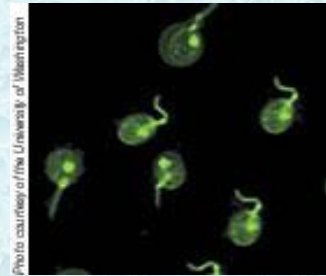
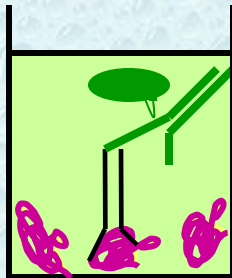
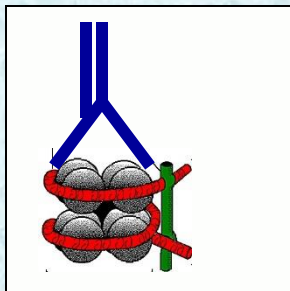


Photo courtesy of the University of Washington

Crithidia IIF



ELISA
dsDNS
(Nukleosome)



Farr-
Assay

Sensitivität	Spezifität	Cut-off
76	45	1:320
13	99	1:10
29 (85)	96	200 U/ml
32	96	-

Autoimmunvaskulitiden

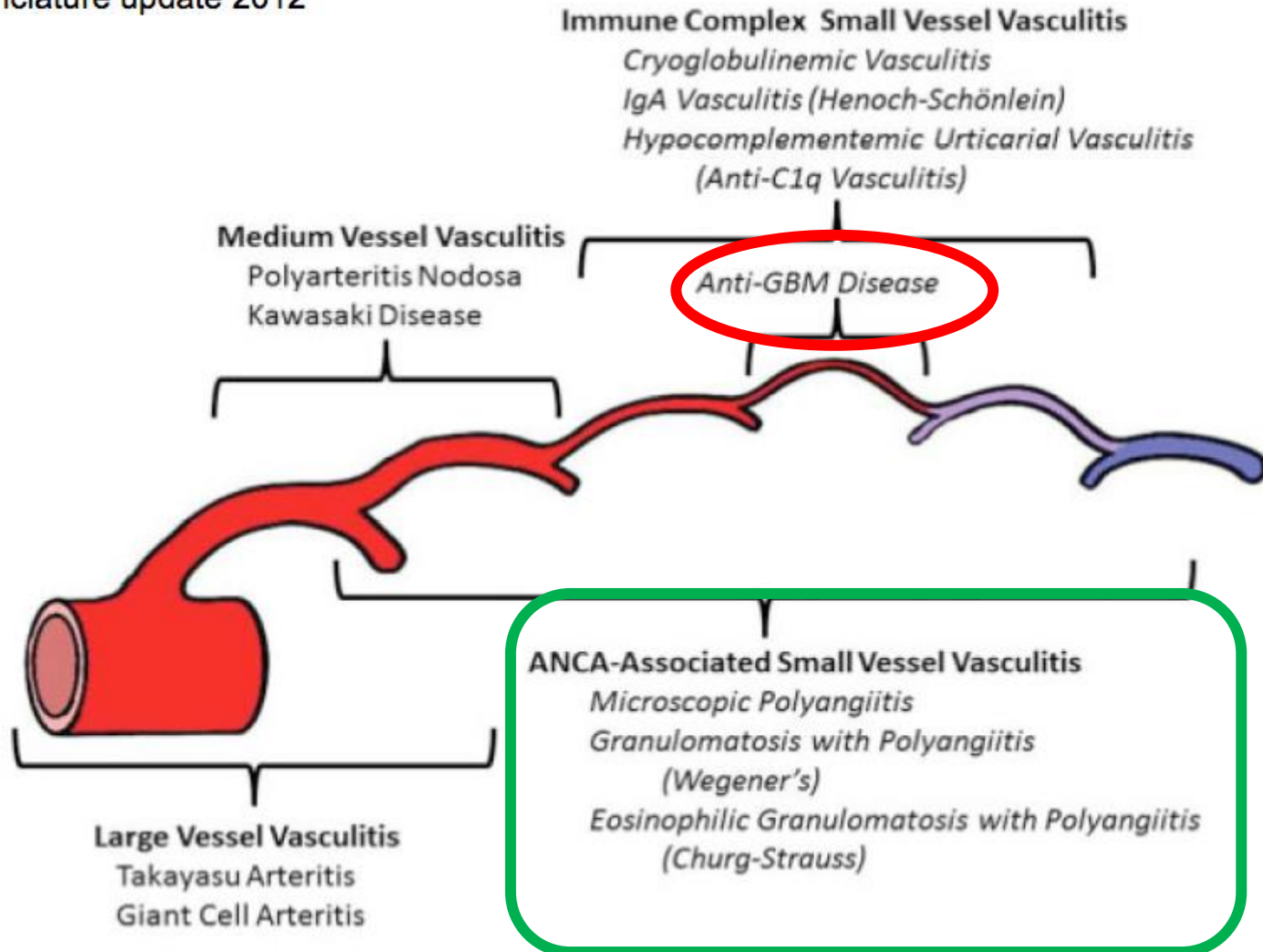
ANCA-assoziierte Vaskulitiden
(Anti-Neutrophile
Zytoplasmatische Antikörper)

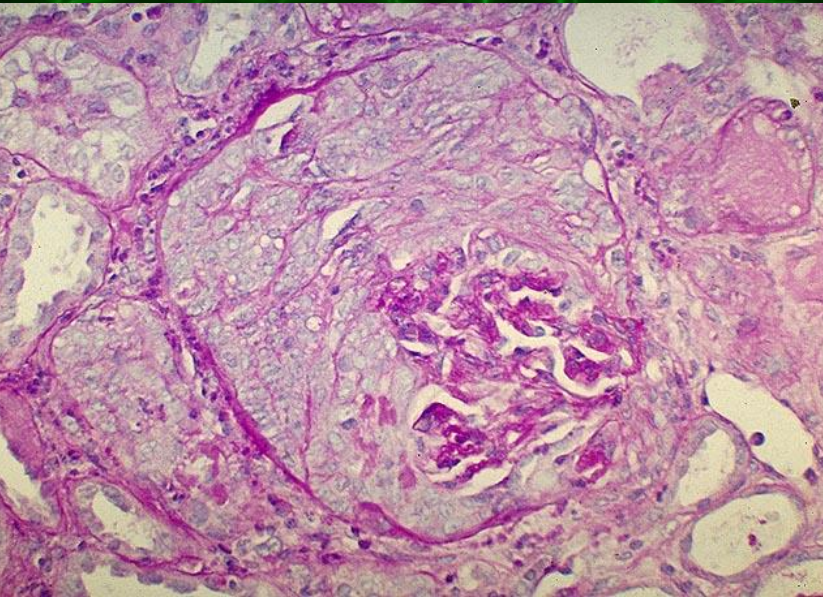
Einteilung der primären Vaskulitiden entsprechend der Chapel-Hill Klassifikation

Vaskulitis großer Gefäße	Takayasu-Arteriitis Arteriitis temporalis "Riesenzellarteriitis"
Vaskulitis mittelgroßer Gefäße	Polyarteriitis nodosa Kawasaki-Syndrom
Vaskulitis kleiner Gefäße	Wegener`sche Granulomatose Churg-Strauss Syndrom mikroskopische Polyangiitis Purpura Schönlein-Henoch essentielle kryoglobulinämische Vaskulitis kutane leukozytoklastische Vaskulitis Autoimmun

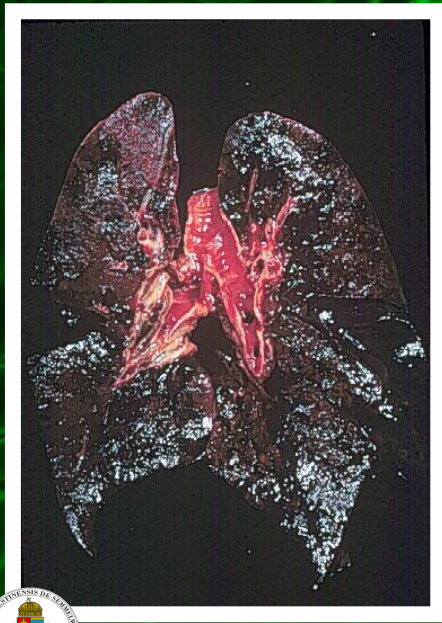
Classification of Vasculitis

Chapel Hill Consensus Criteria
Nomenclature update 2012





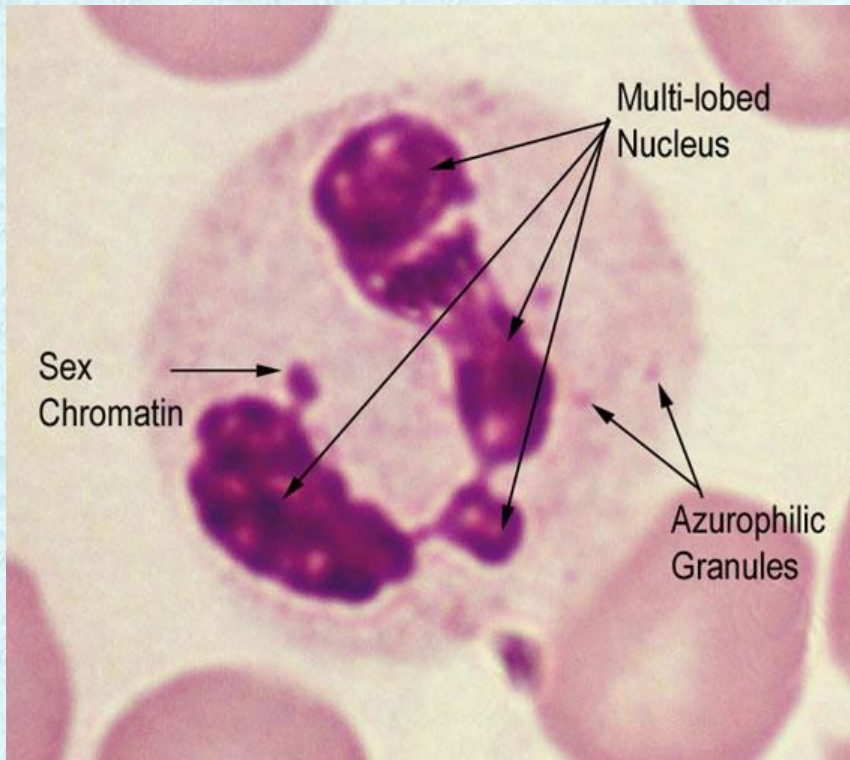
Goodpasture-Syndrom anti-GBM-Syndrom



**Autoantikörper gegen
die glomeruläre Basalmembran
($\alpha 3$ Kette der Typ IV Kollagen)**

**anti-GBM Autoantikörper -
einzige Notfallanalyse
in der Autoimmundiagnostik**

Inhalt der Azurophilen Granula in neutrophilen Granulozyten



Myeloperoxidase (stark kationisch)

Serinprotease z.B.: **Proteinase-3**

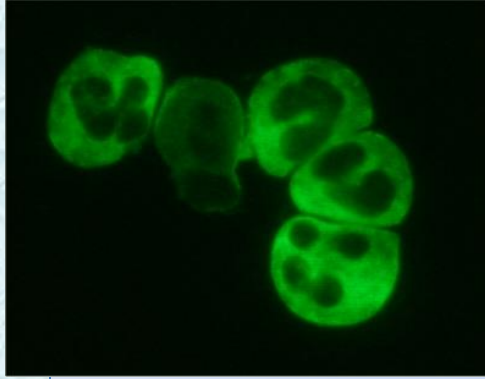
BPI (bactericidal permeability increasing protein)

Elastase

Cathepsin G

Spezifische Körperchen: Lactoferrin

c-ANCA - p-ANCA



Indirekte Immunfluoreszenz:
zytoplasmische Reaction

Immunoassay
Antigenspezifität :

Proteinase 3
(PR3-ANCA)

Wegener'sche Granulomatose
(50 –95 %)



Indirekte Immunfluoreszenz:
perinucleäre Reaction

Immunoassay
Antigenspezifität :

Myeloperoxidase
(MPO-ANCA)

Churg-Strauss-Syndrom
(ca. 60%)
Microskopische Polyangiitis
(ca. 70%)

(EtOH)

50um

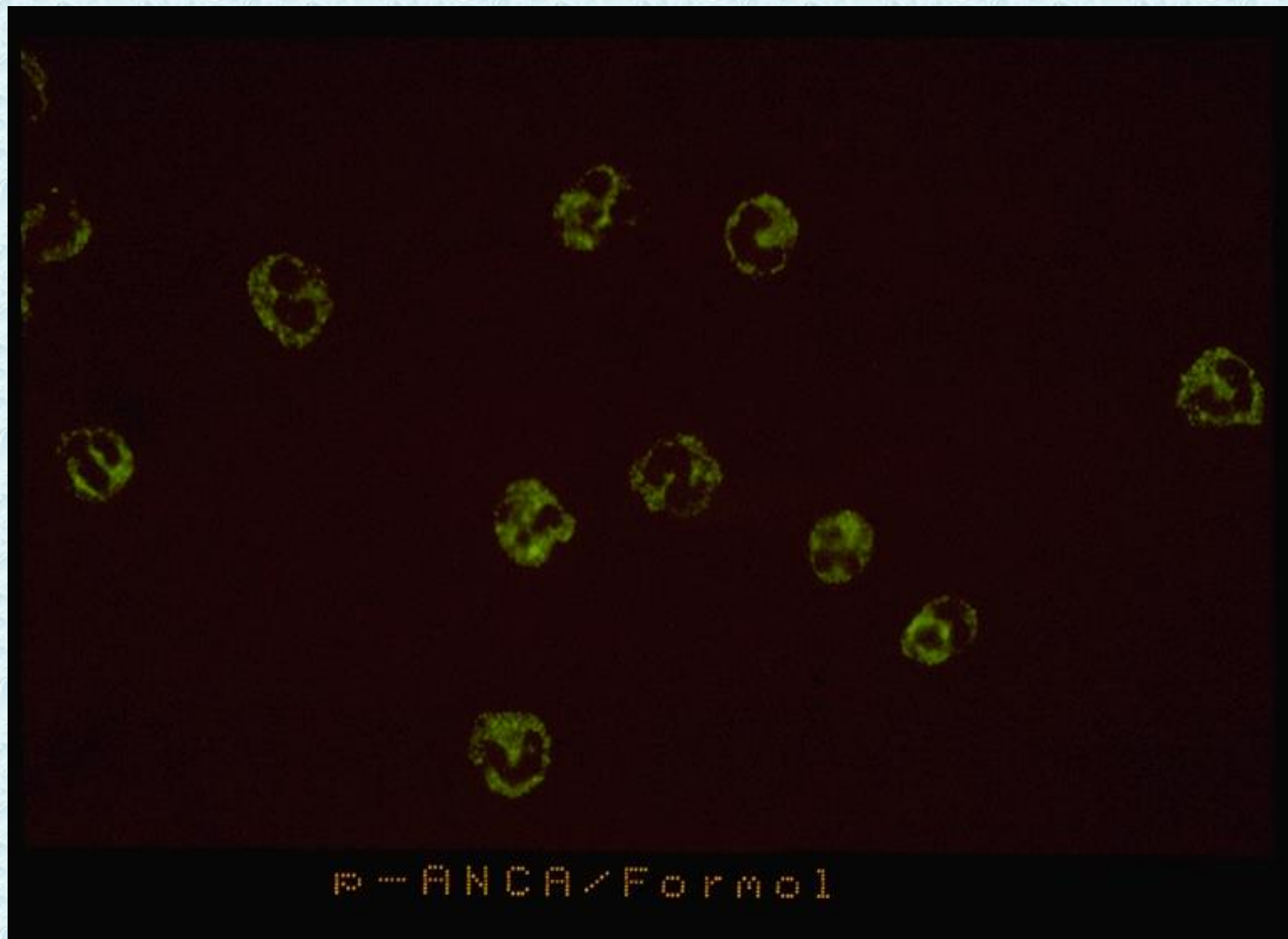
c-ANCA

(EtOH)

50um

p-ANCA





Gewebespezifische Autoantikörper

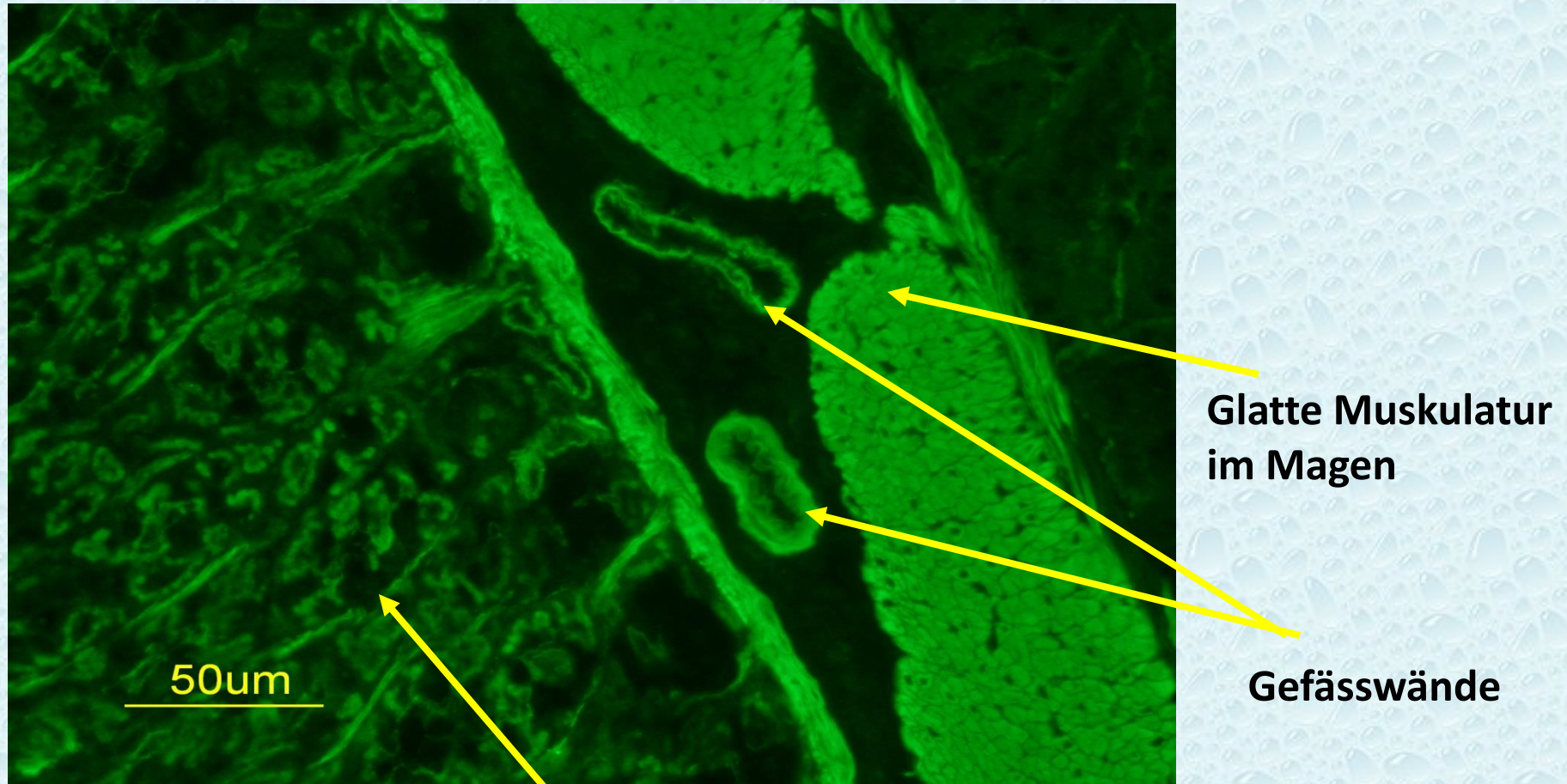
Leber/Niere/Magen Substrat

(Liver/Kidney/Stomach = LKS)

A histological section of a placenta, showing the chorionic plate, decidua, and fetal membranes. Three red arrows point to the chorionic plate, decidua, and fetal membranes.

Autoimmunhepatitis Typ I

Antiglatte Muskulatur (AgM) im Mausmagen



**Kleinere axilliäre Gefäße in der Lamina propria
in der Magenschleimhaut**

Autoimmunhepatitis Typ I

- ANA Positivität mit einem hohen Titer
- Antiglatte Muskulatur

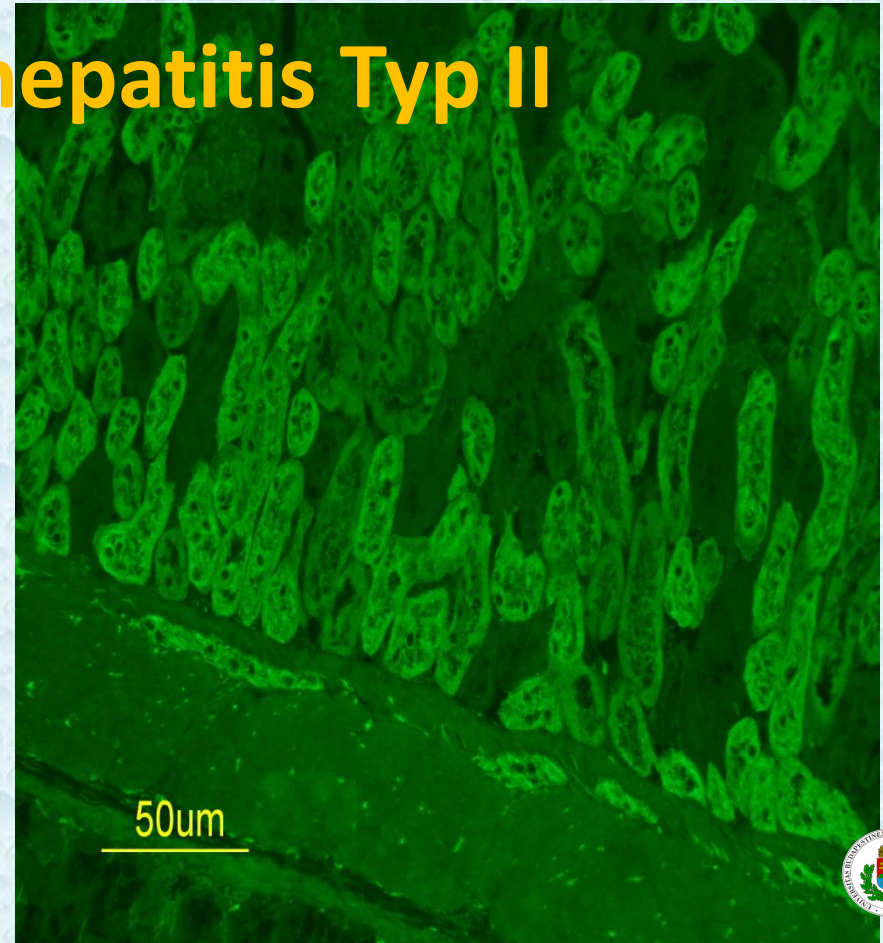
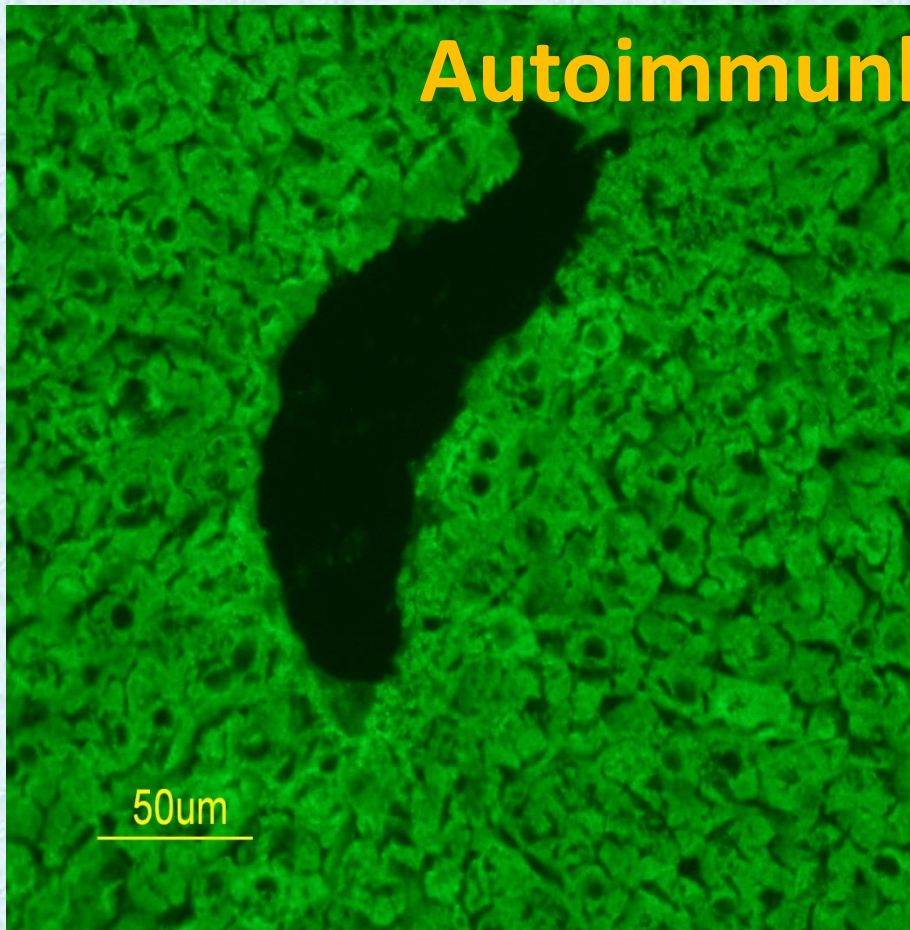
AgM Bestätigung auf Dünndarmepithel Zellen

Nur der Autoantikörper gegen die ***Aktinfilamente***
(*F-aktin*) des Zytoskeletts ist spezifisch bei einer
Autoimmunhepatitis Typ I

Leber-Nieren Mikrosomen (liver-kidney microsomes)

LKM-1

Autoimmunhepatitis Typ II



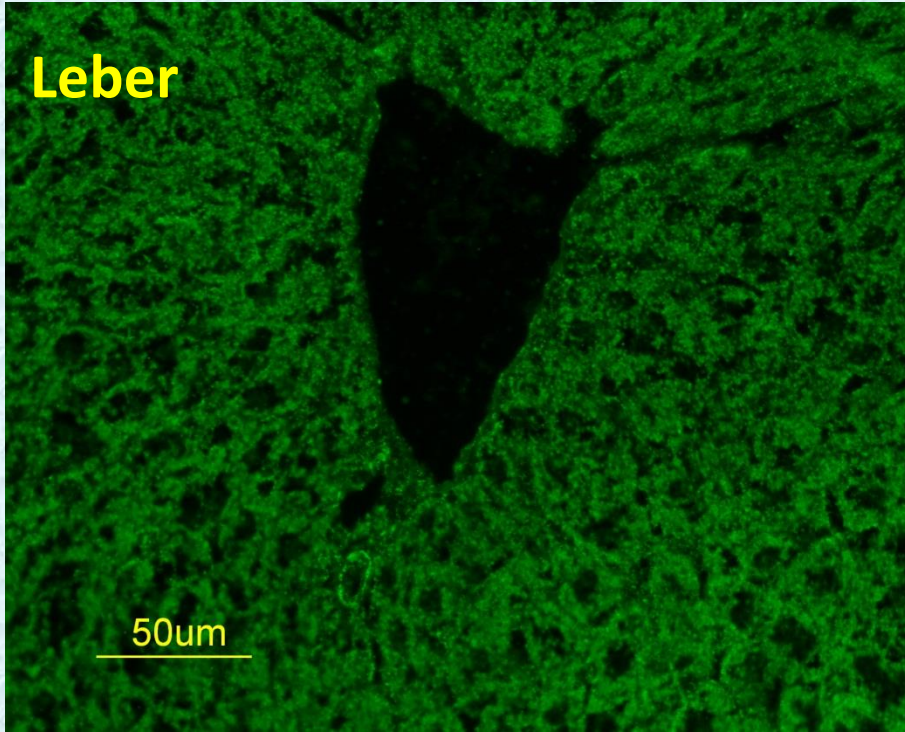
Leberzytosol Antikörper

liver cytosolic (LC1)

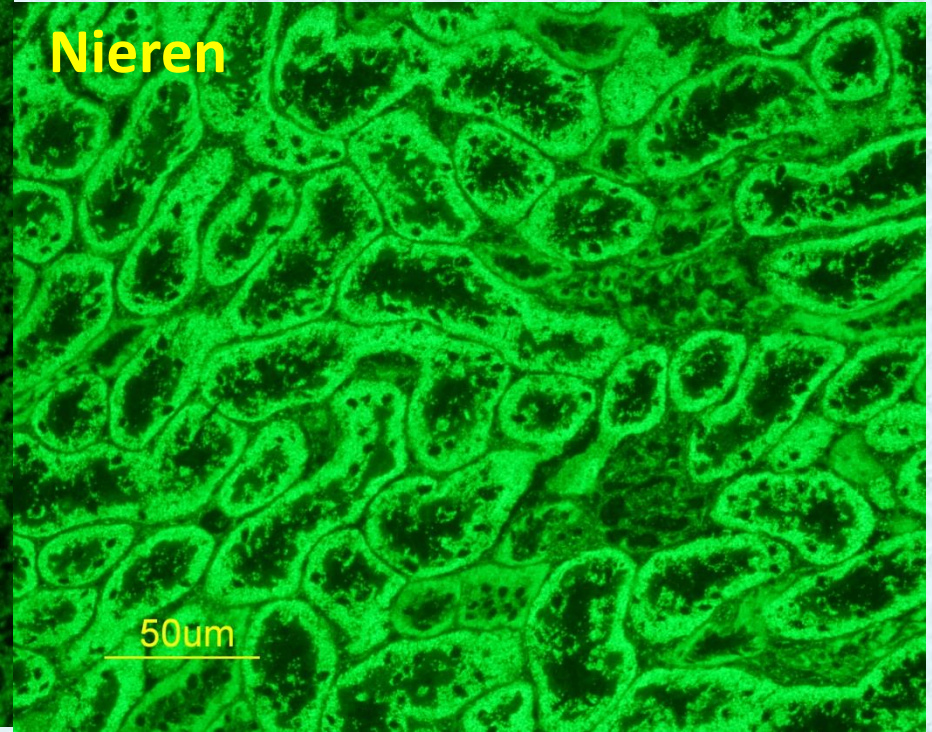
Autoimmunhepatitis Typ II

antimitochondriale Antikörper - *Primär biliäre Zirrhose*

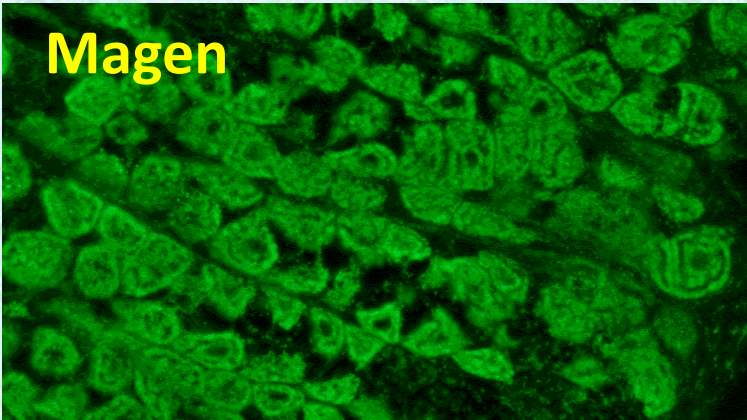
Leber



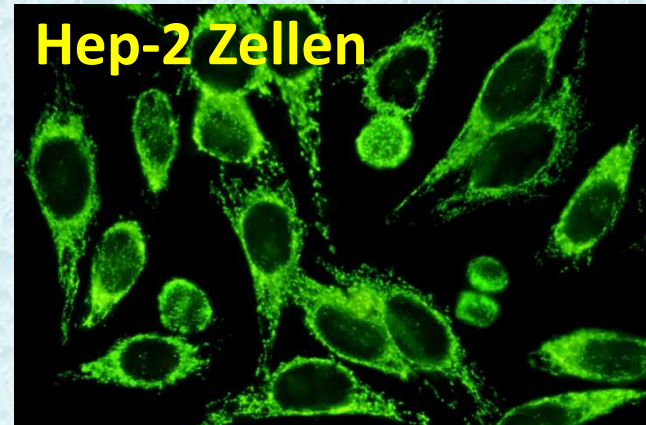
Nieren



Magen

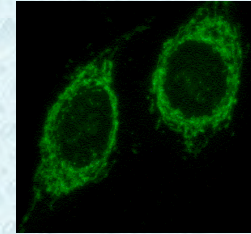


Hep-2 Zellen



Bewertung der Autoantikörper

- prädiktive

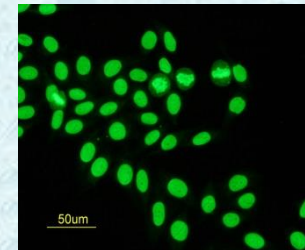


antimitochondriale Antikörper bei PBZ

- präventive

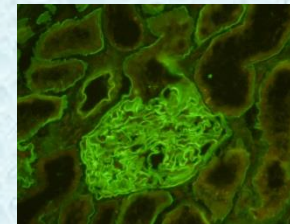
natürliche Autoantikörper

IgM anti-dsDNS bei SLE



- pathogen

anti-GBM Antikörper bei Goodpasture-Syndrom

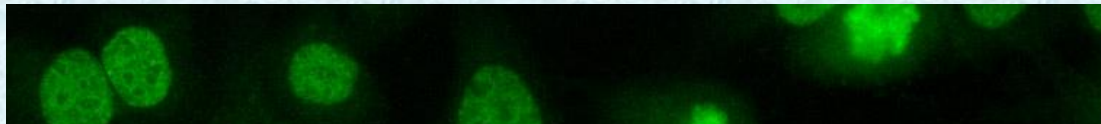


Verlaufsparmeter

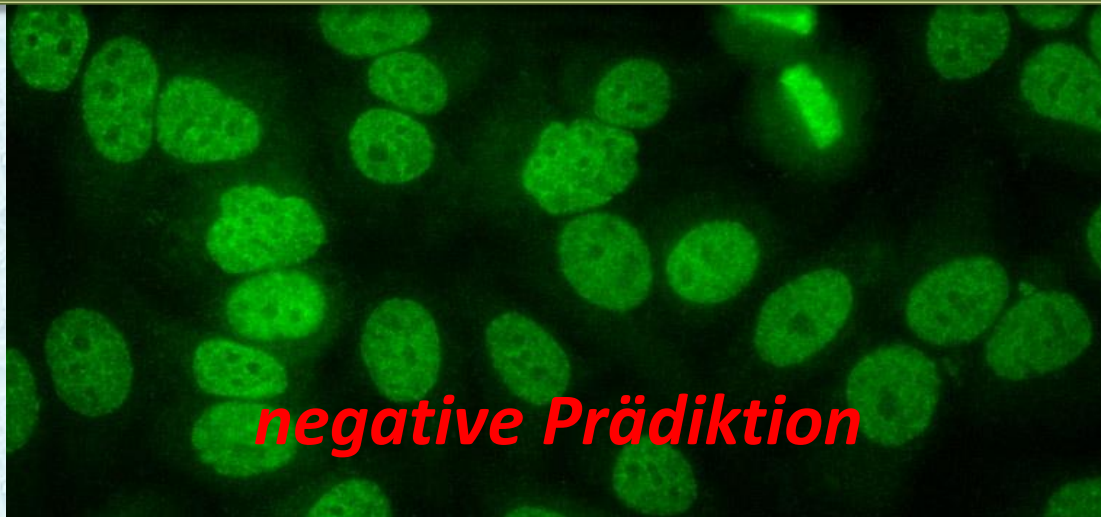
ANA Positivität

ist Kennzeichnung einer systemischen autoimmun-
rheumatischen Erkrankung

aber ein dicht feingranuliertes Muster
(dense fine speckled = **DFS-70**) :



es ist nicht alles Gold, was glänzt

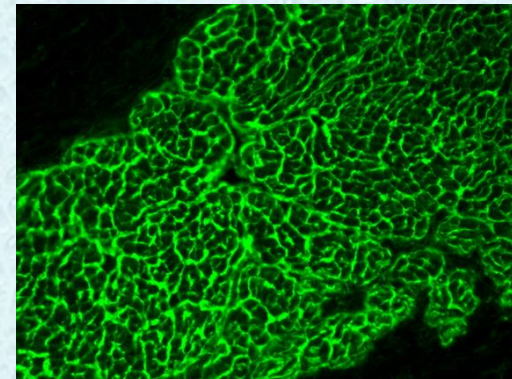
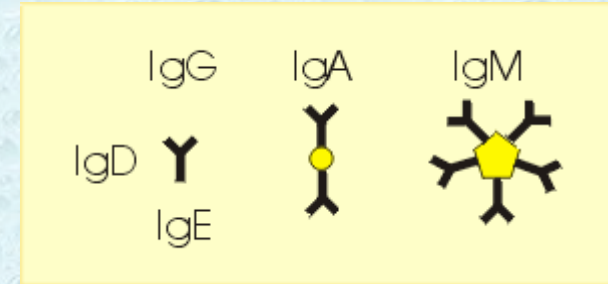


IIF in der Autoimmunserologie

- zuverlässige screening-Methode
- eine große *Vielfalt* der Antigene auf den Zellen und in der Gewebe
- naturnahe native Konformation
- seltene Autoantikörper haben keinen **Bestätigungstest**
- Automatization ist unterwegs

Immunglobulin Isotypen der Autoantikörper

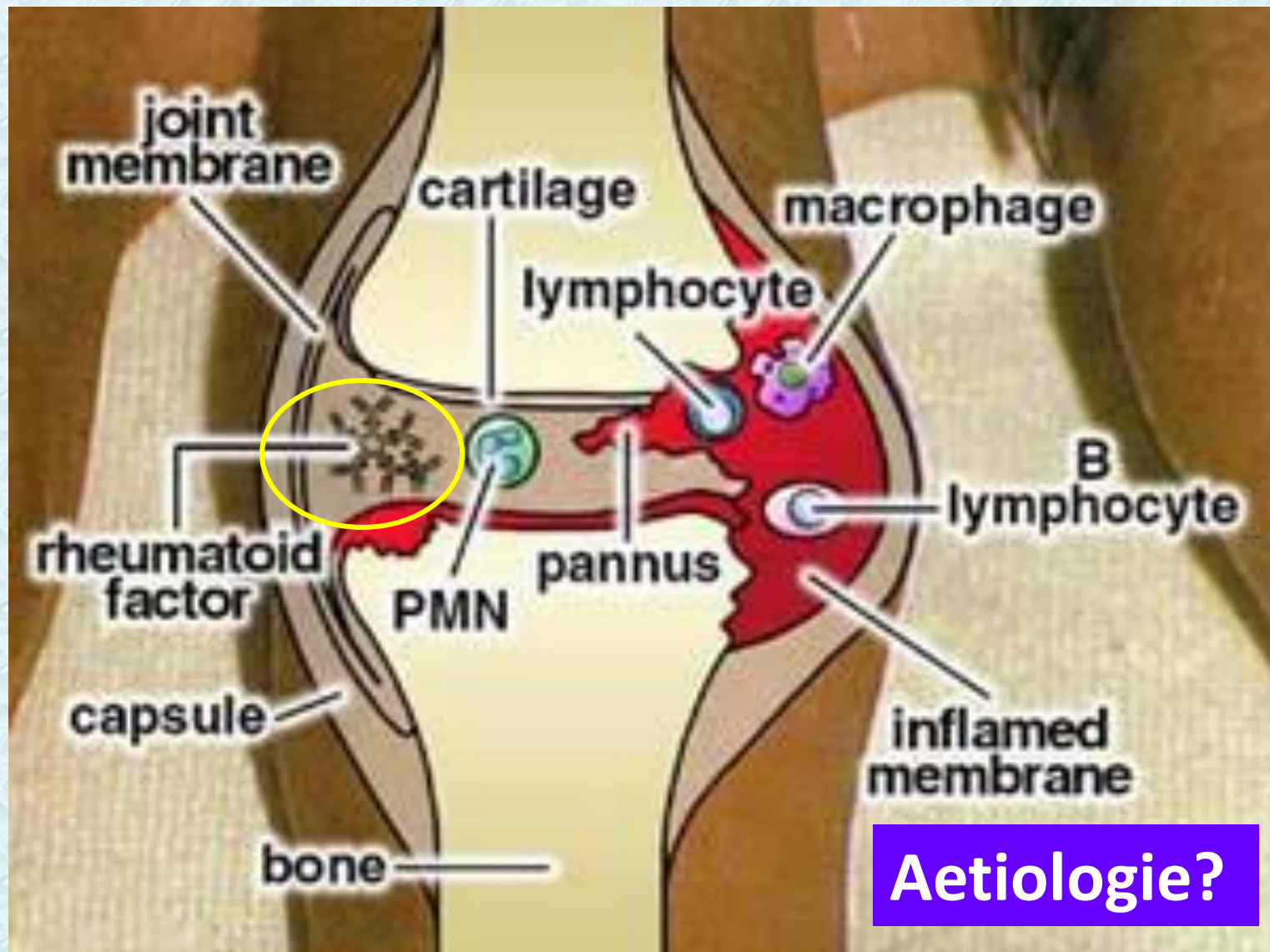
- Meistens gehören zur **IgG** Klassen.
- **IgM** Isotypen bei der autoimmun neurologischen Erkrankungen kommen vor
- **IgA** Isotypen: Epithel-Oberfläche sind betroffen
z.B. Zöliakie
glutensensitive Enteropathie
- **IgE** – Allergie-Antikörper



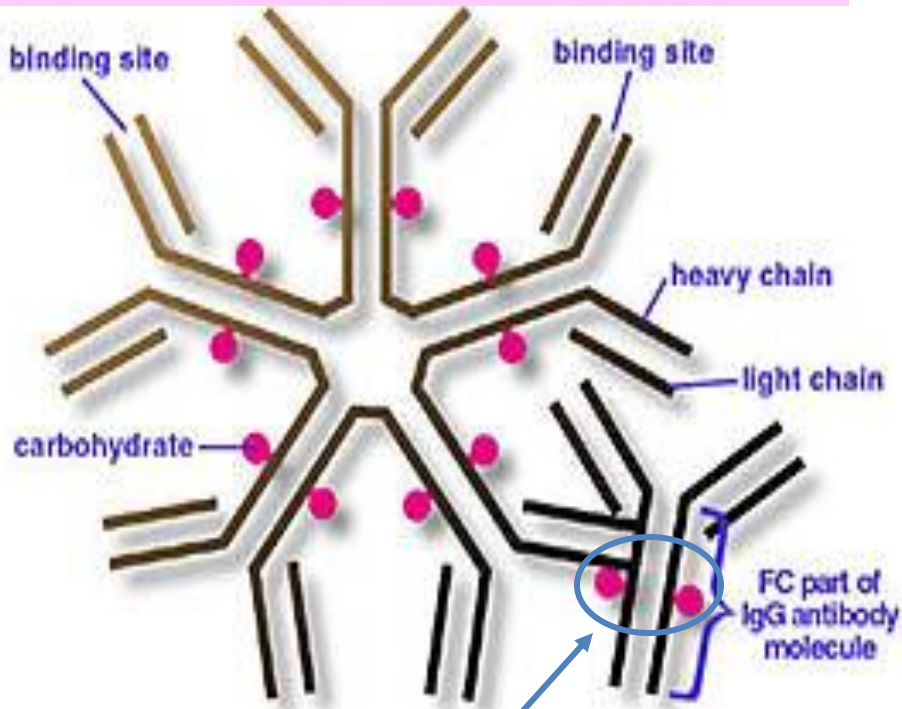
Autoantikörper der Körperflüssigkeit

- Synovialflüssigkeit -bei Rheumati oder Arthritis
- Die *intrathekale* Antikörpersynthese in der neurologische autoimmune Erkrankungen
z.B.: Autoimmun-Enzephalopathien
anti-NMDAR-Enzephalitis –
Liquoruntersuchung

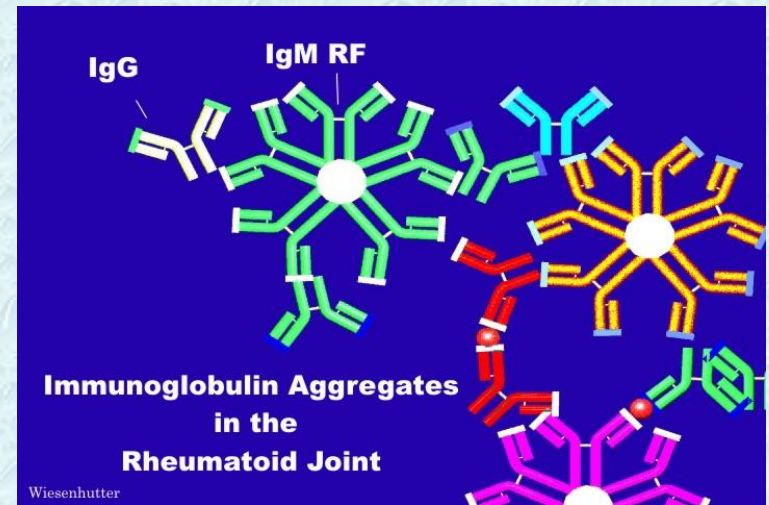
Entzündliche Infiltrate in der Gelenke



Rheumafaktor



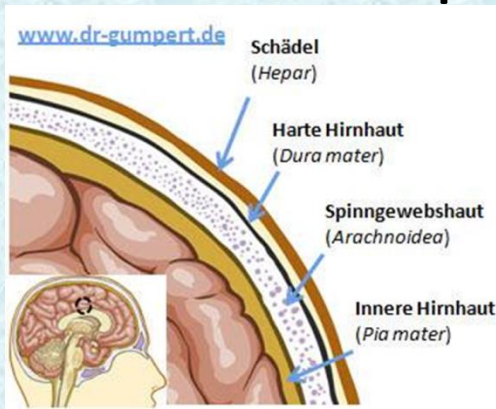
Eigene IgG hat Zuckerdefizient

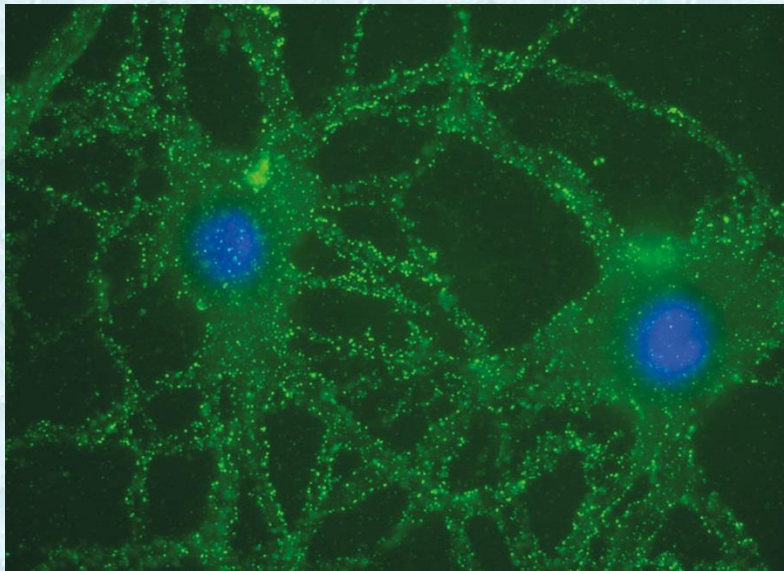
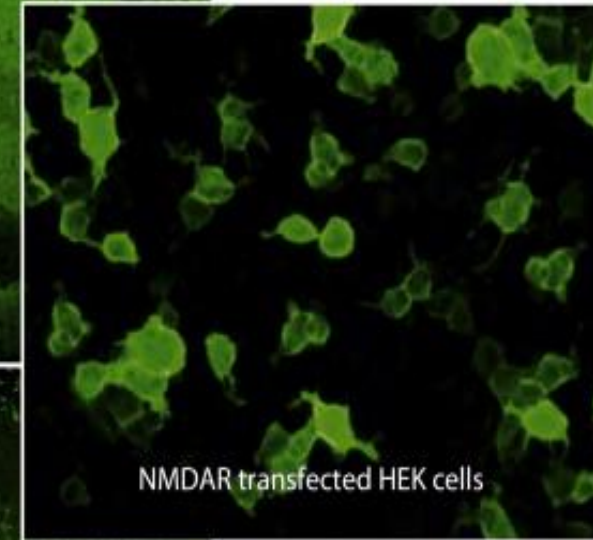
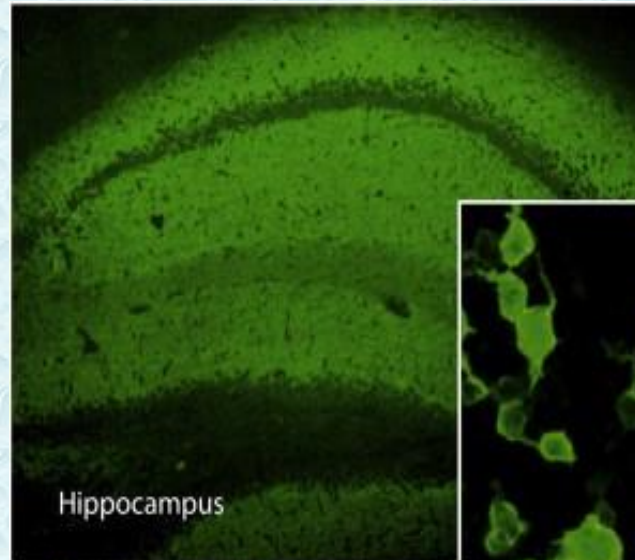
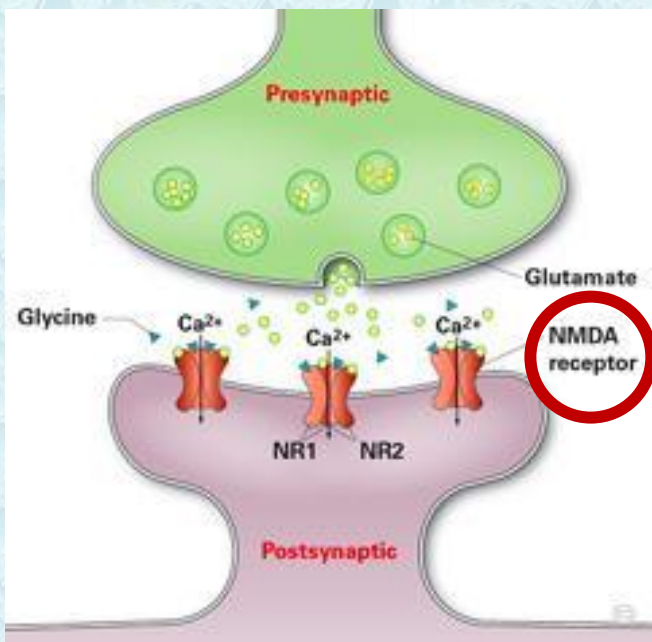


- RF sind am häufigsten IgM, aber IgA oder IgG kommen auch vor.
- RF sind Autoantikörper die den Fc Region der eigenen IgG Moleküle binden.

Autoantikörper der Körperflüssigkeit

- Synovialflüssigkeit -bei Rheumati oder Arthritis
- Die *intrathekale* Antikörpersynthese in der neurologische autoimmune Erkrankungen
z.B.: Autoimmun-Enzephalopathien
NMDAR-Enzephalitis – *Liquoruntersuchung*





Ende

