



Autoimmundiagnostik

Ein Übersicht

Zsuzsanna Beleznay

Institut für Labormedizin

beleznay.zsuzsanna@med.semmelweis-univ.hu

**Die Autoimmunerkrankungen haben
eine unbekannte Aetiologie**

Professor Rolf Zinkernagel

,...an autoimmune disease is a viral disease in which the virus is unknown'

“Viral déjà vu”

90-er Jahre



Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM (1996) Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. Immunol Rev 152:21–45



Immunität

- Unterscheiden zwischen selbst und fremd

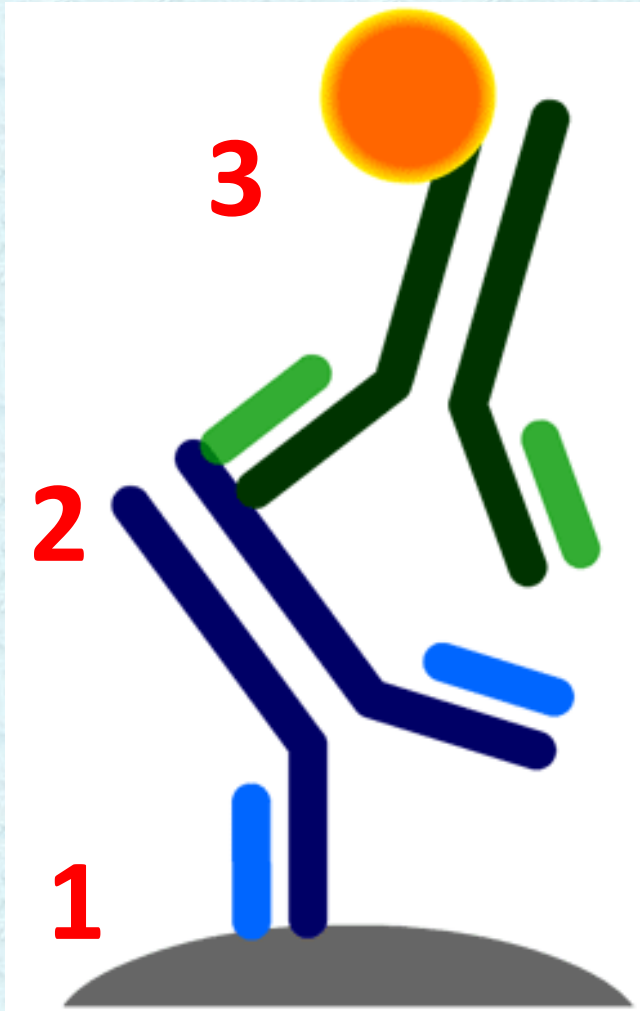


- ~~• Selbsttoleranz~~

Autoimmunität

Diagnose: Antigen-**Autoantikörper** Komplex

Prinzip der Autoantikörper-Bestimmung



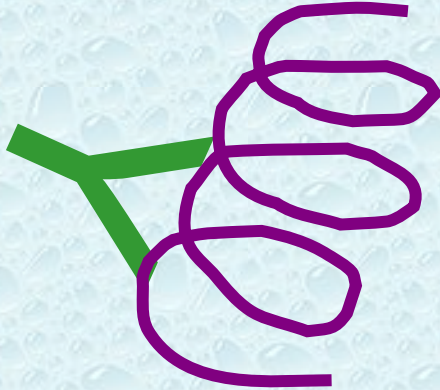
1. In der Fest- oder Flüssigkeitsphase sind potenzielle Antigene
2. Untersuchende *primäre Autoantikörper* – vorverdünnte Patientenserum
3. Visualisierung der vorhandenen Antigen-Autoantikörper Komplexe - *Sekundäre Antikörper*- Anti-Human- Immunglobulin

Markierung ist abhängig von des Testverfahrens

Immunologische Methoden

Immunopräzipitation

*Farr-Assay
mit Ammoniumsulfat
Präzipitation*

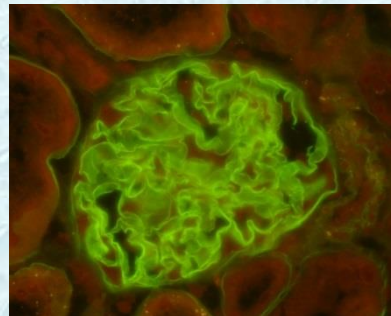


Konformationsepitope

ELISA



Indirekt
Immunfluoreszenz



Blot

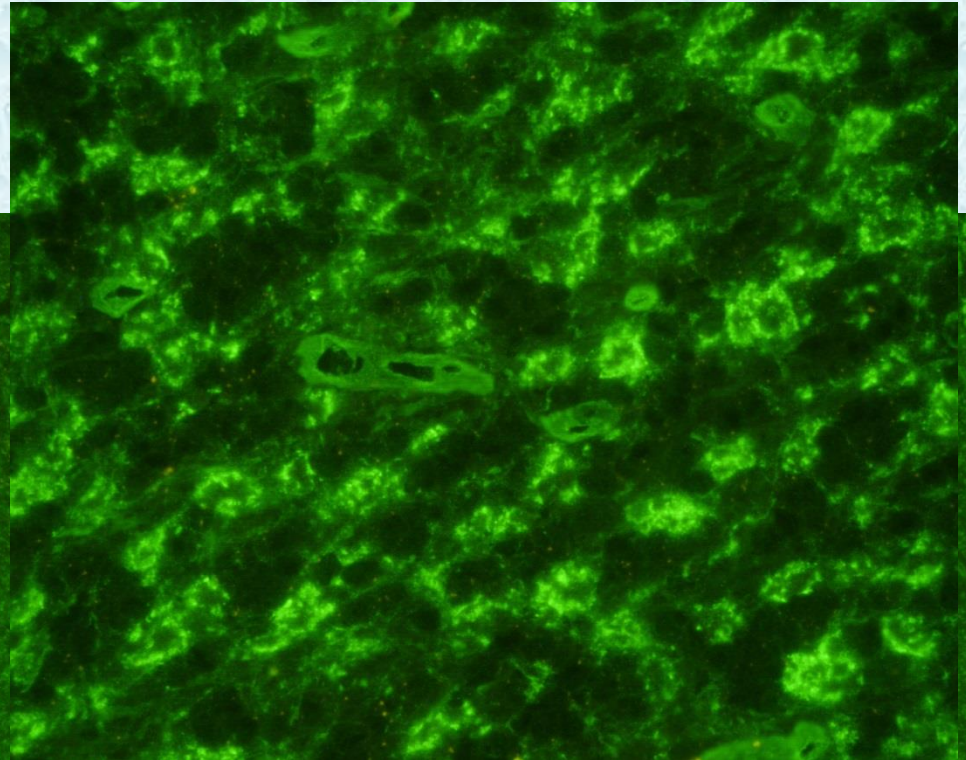


lineare Epitope

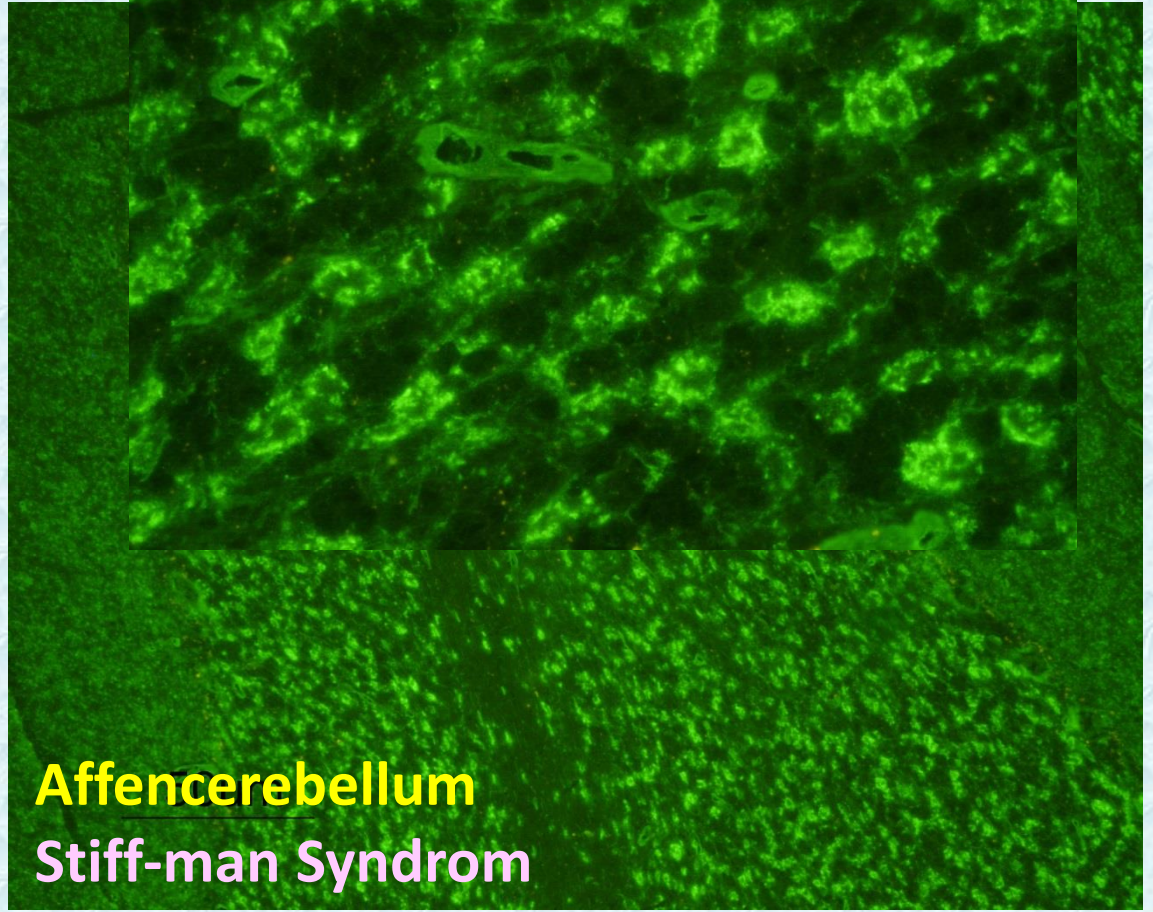
Radioimmunoassay

Gleicher Antigen – unterschiedliches Krankheitsbild

Endokrin Pankreas
IDDM



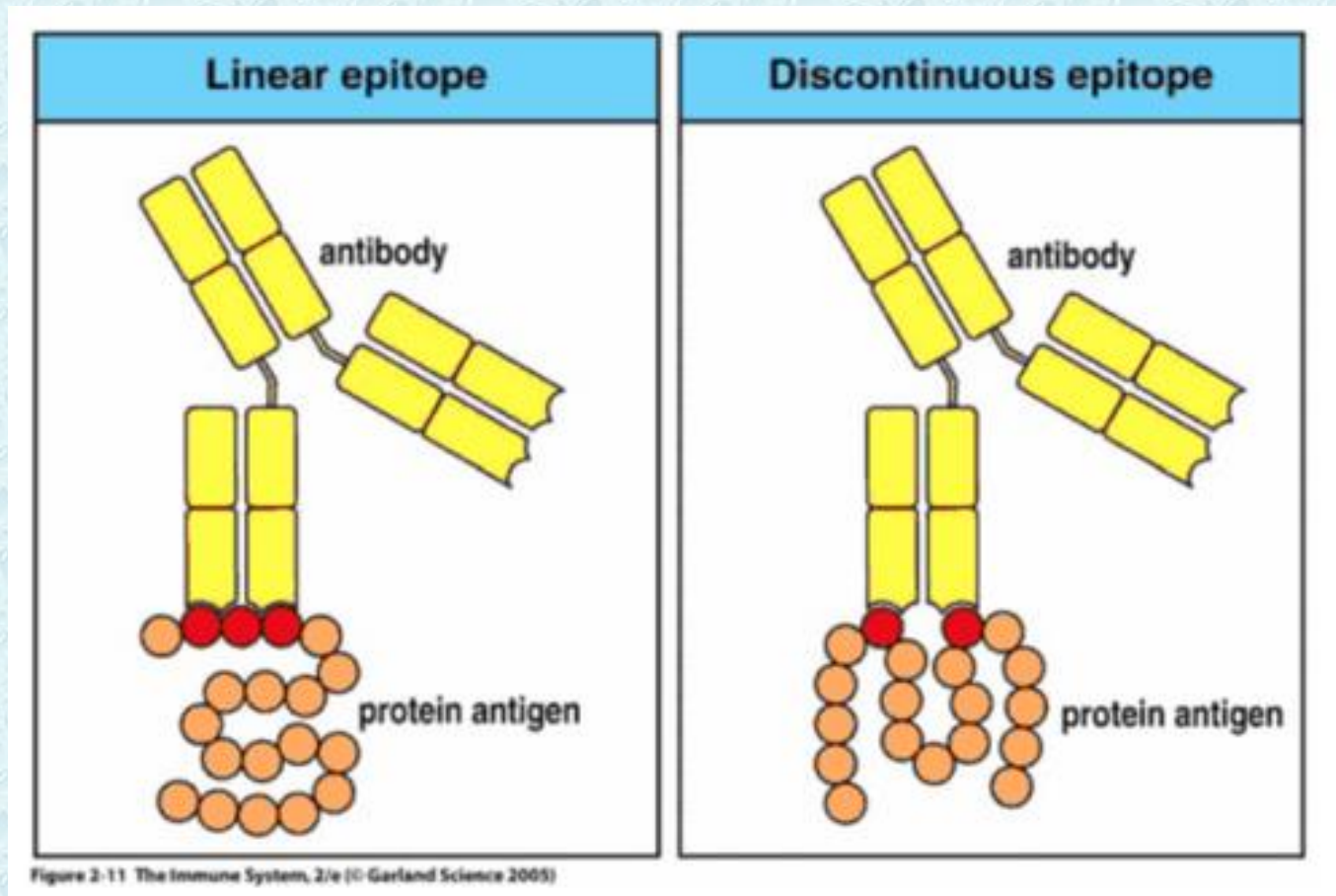
Affencerebellum
Stiff-man Syndrom



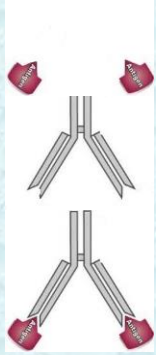
Keine Kreuzreaktion

- **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



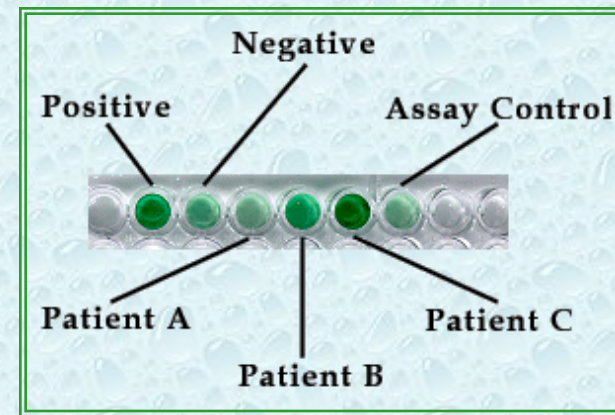
Das Testverfahren sind unterschiedlich: Immunoblot bzw. Radioimmunassay



Antigen
Autoantikörper vom Patientenserum

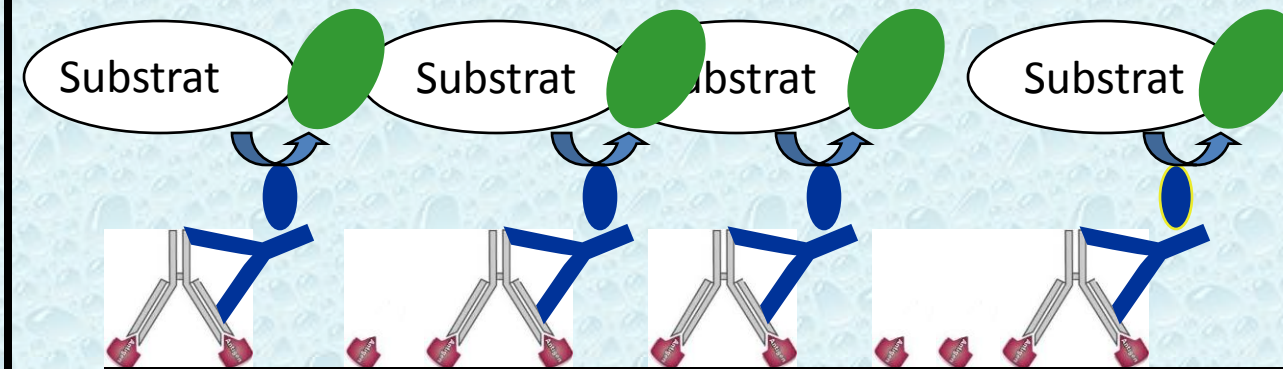
Antigen-Autoantikörper Komplex

Enzym-markierter antihuman Antikörper



ELISA

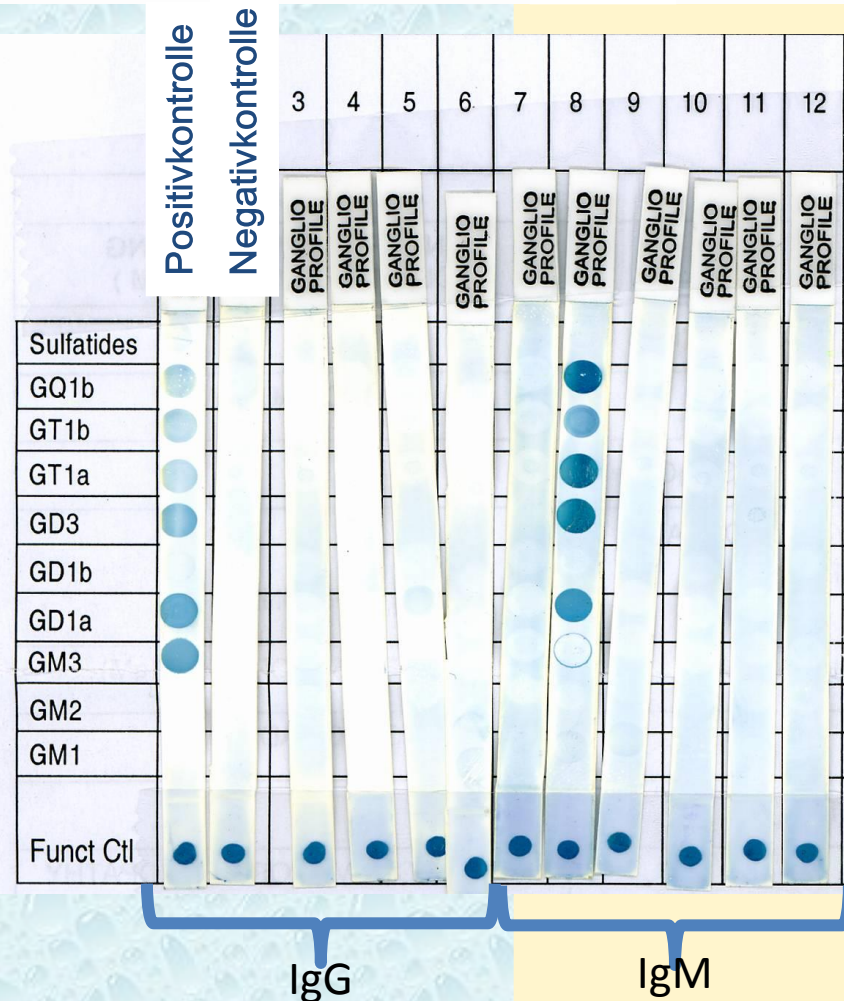
enzyme linked immunosorbent assay



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

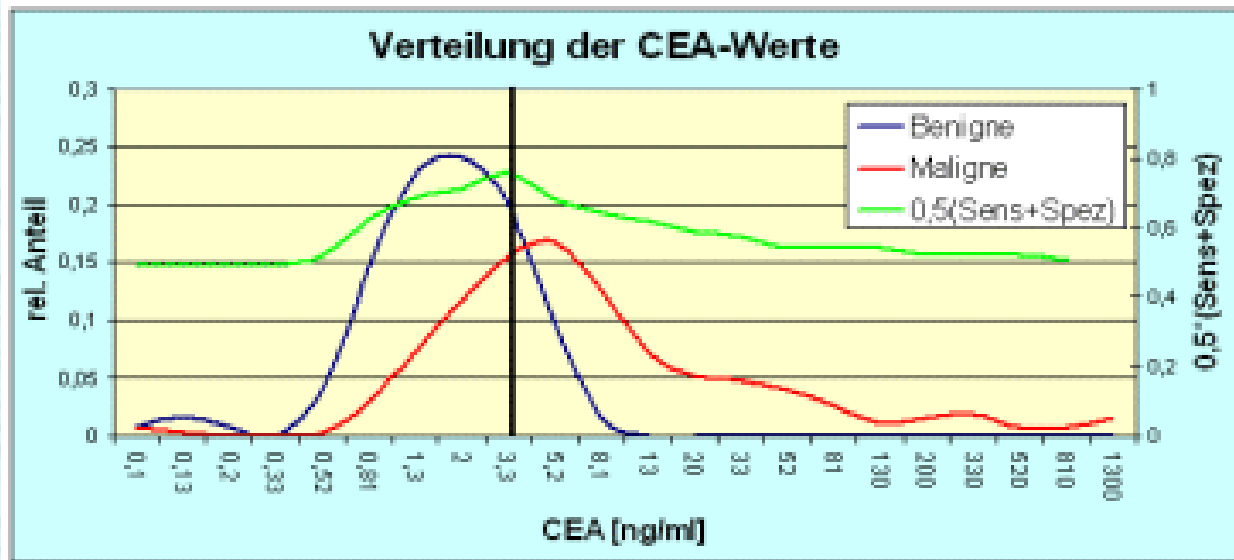
DOTZEN® Gangliosides Profile Ab

	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	●	●		●					●



Monospezifisches Kit

- Cut-off Wert von der Firma definiert



- Jedes Labor sollte es für den eigenen Patientengut bestimmen

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**

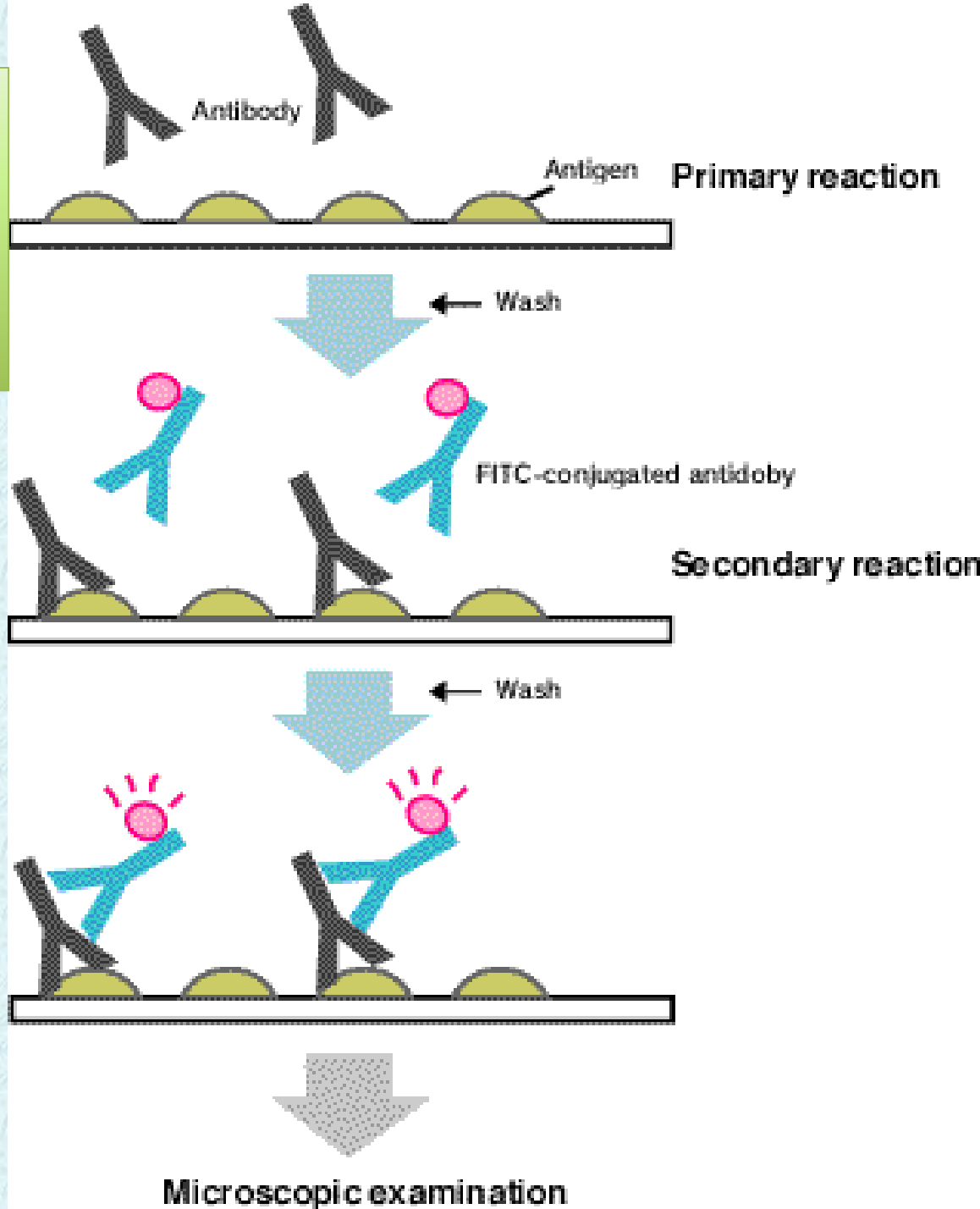
	Tatsächlicher Sachverhalt		
	krank	gesund	
Positiver Befund	A richtig positiv	B falsch positiv	Sensitivität = $A / (A+C)$
Negativer Befund	C falsch negativ	D richtig negativ	
Insgesamt	A + C	B + D	Spezifität = $D / (B+D)$

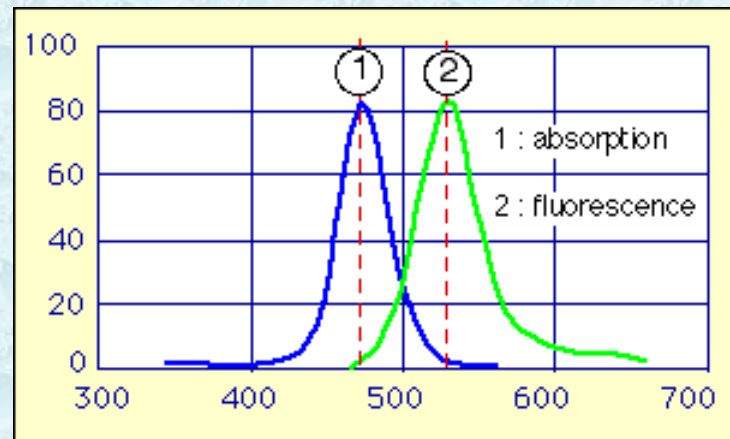
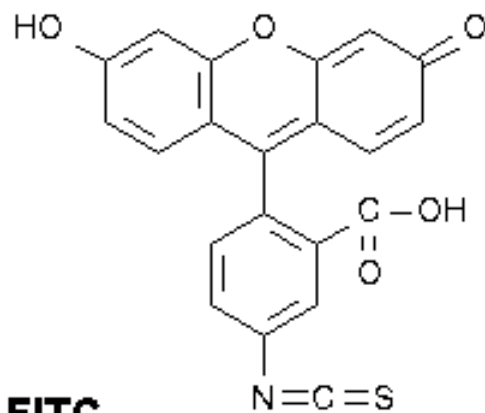
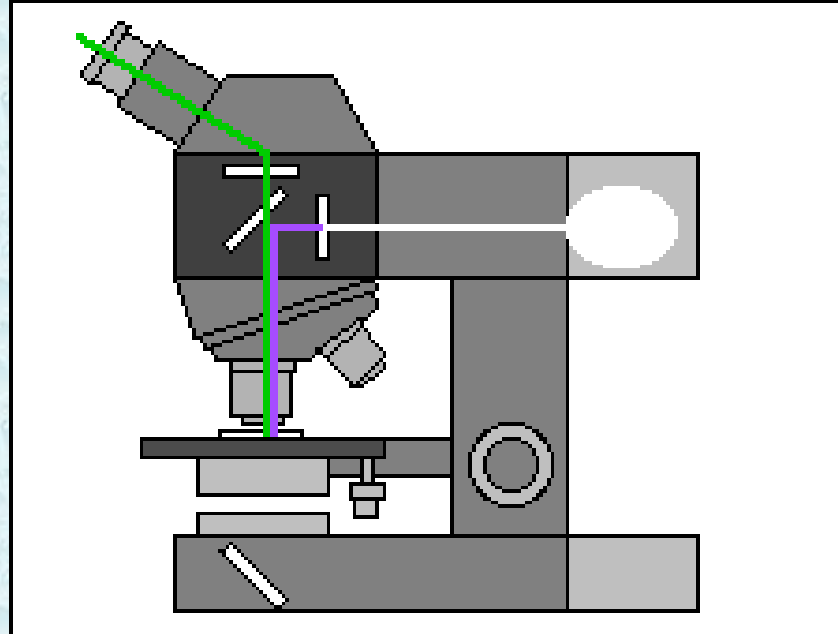
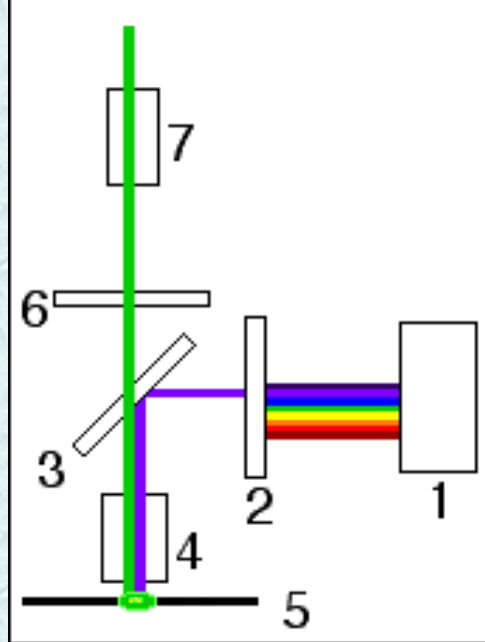
Allgemeine Screening-Methode: Indirekte Immunfluoreszenz



Substrat:

- Zellen
- Gewebe
(organspezifisch)





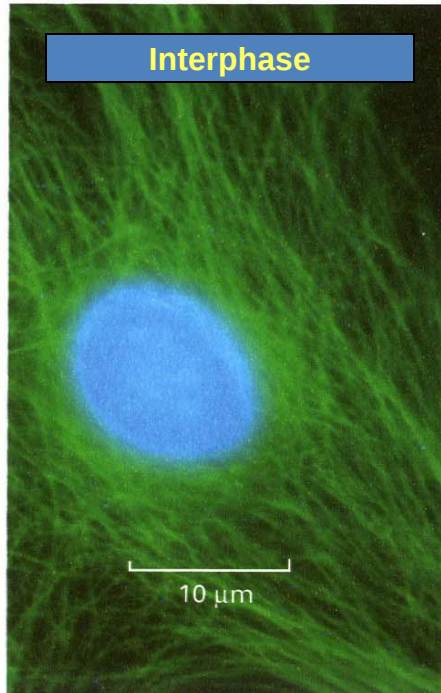
kurzwelliges Licht absorbiert - langwelliges emittiert

50um

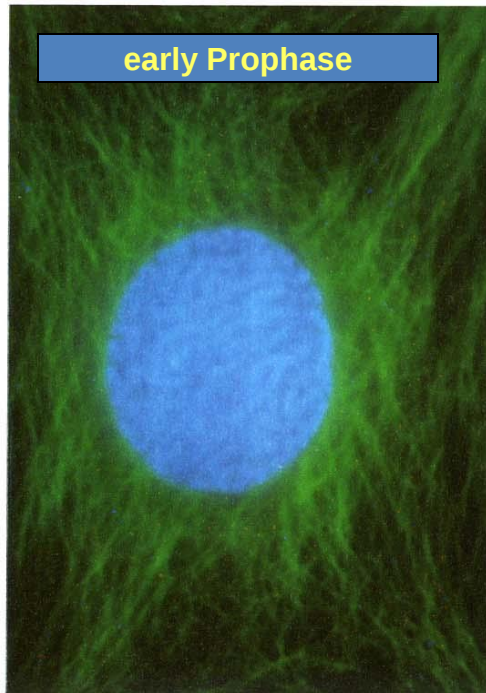
Antinukleäre Autoantikörper auf Hep-2 Zellen

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

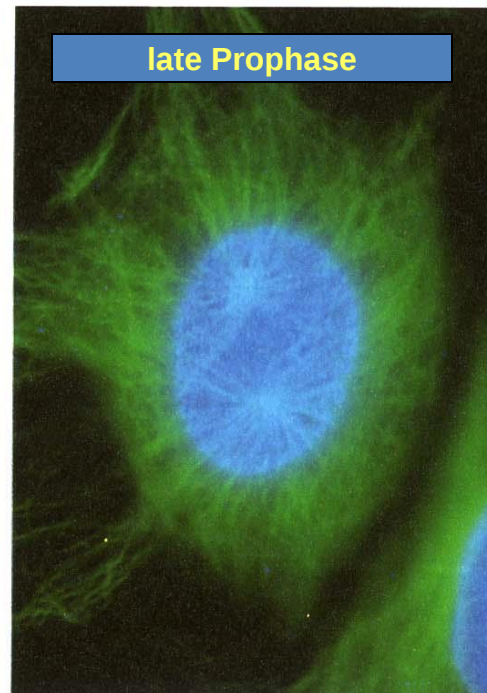
Interphase



early Prophase



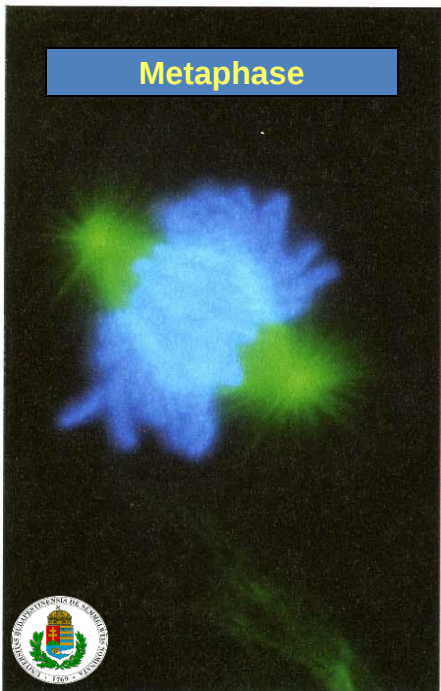
late Prophase



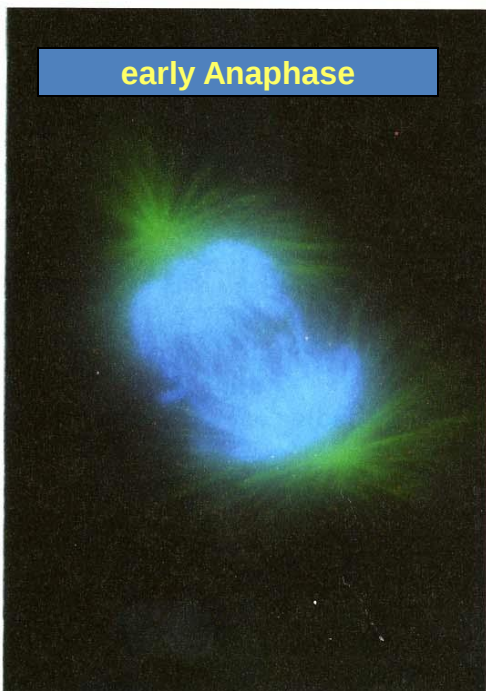
Prometaphase



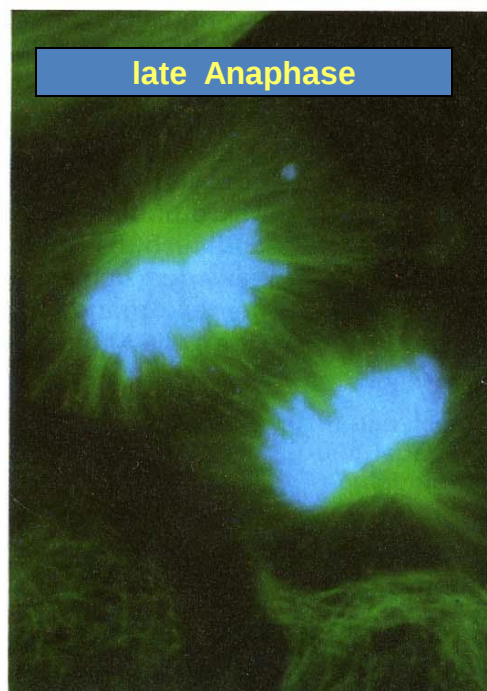
Metaphase



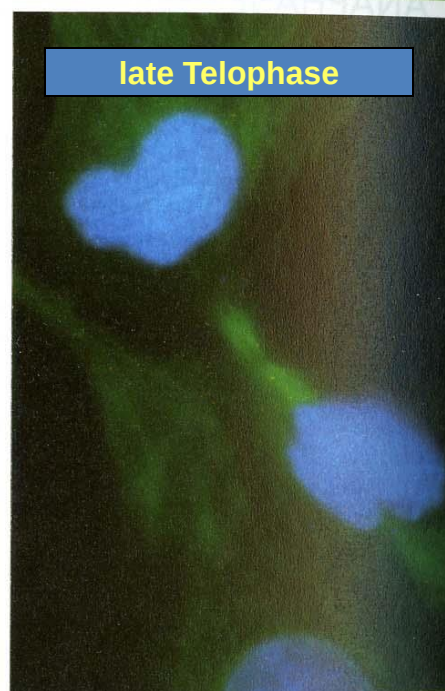
early Anaphase



late Anaphase



late Telophase



HEp-2

Metaphase

Telophase

Interphase

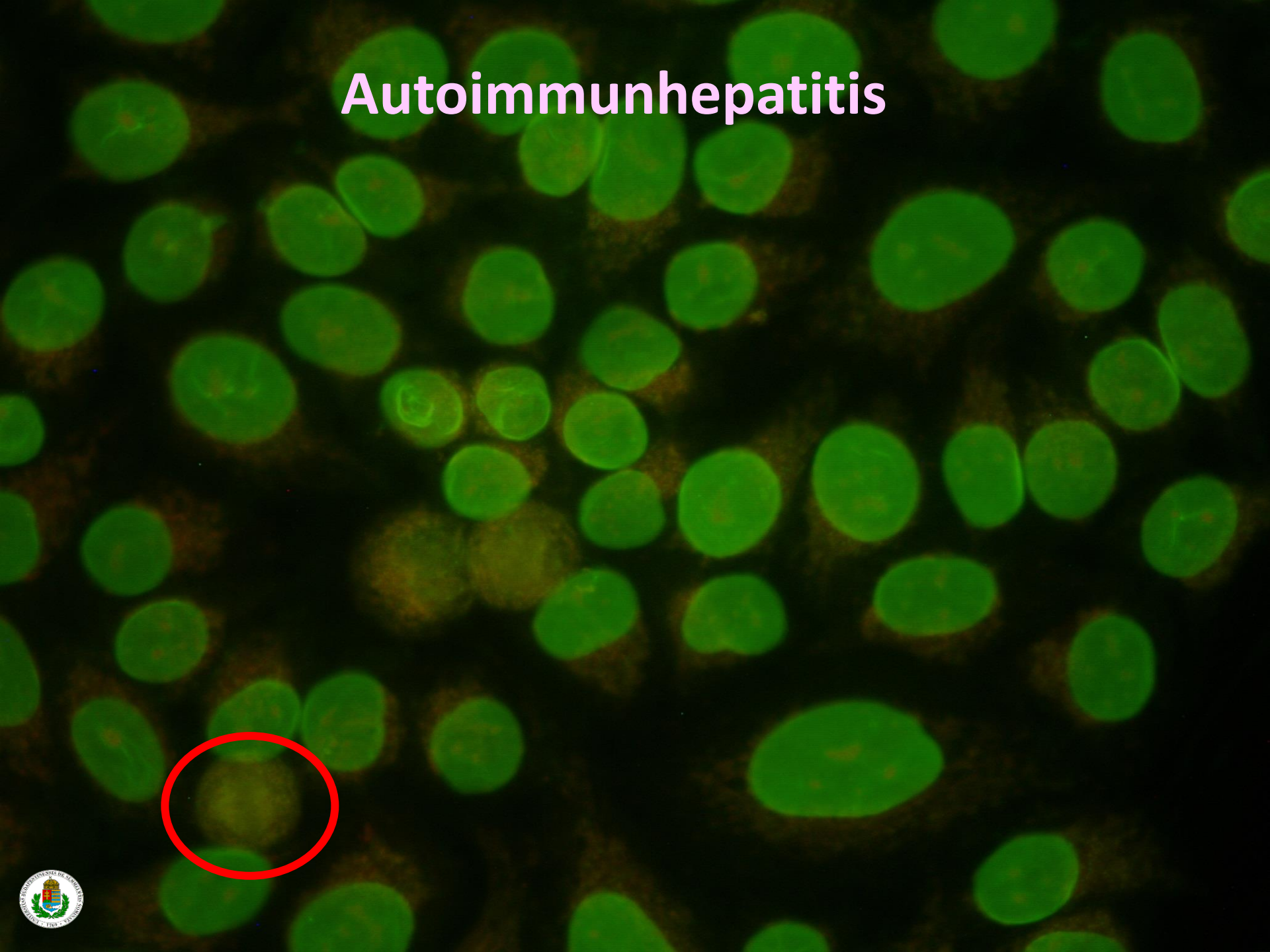
Prophase



Systemisches lupus erythematosus (SLE)



Autoimmunhepatitis



Proliferation assoziierte Antigene

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

PCNA

proliferating cell nuclear antigen

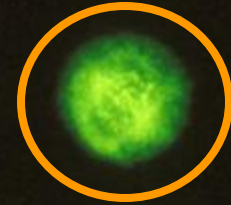
SLE



Pleomorph Muster ohne Mitose



Centromer -F



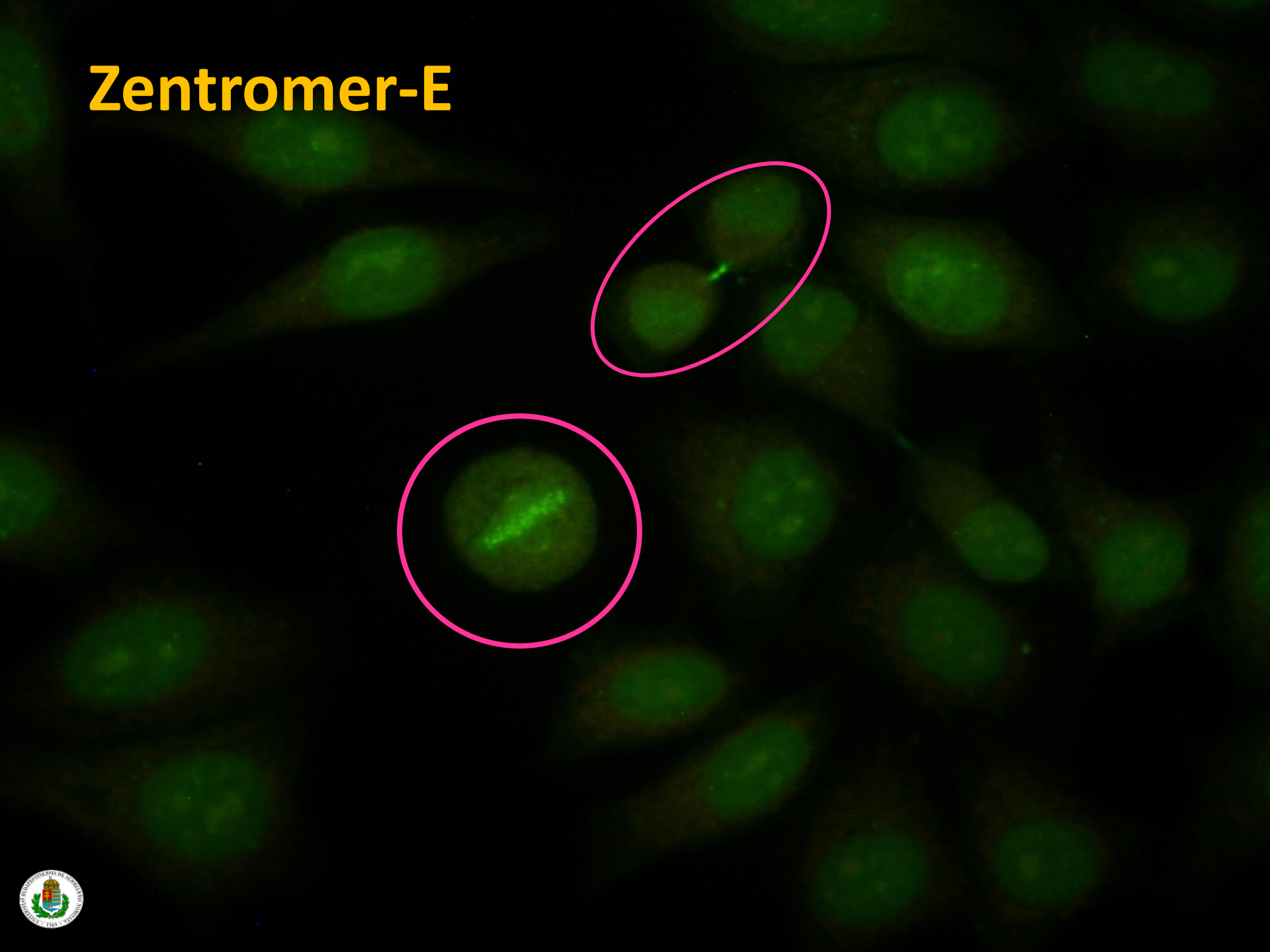
Neoplasie

Pleomorph Muster mit positiver Mitose





Zentromer-E



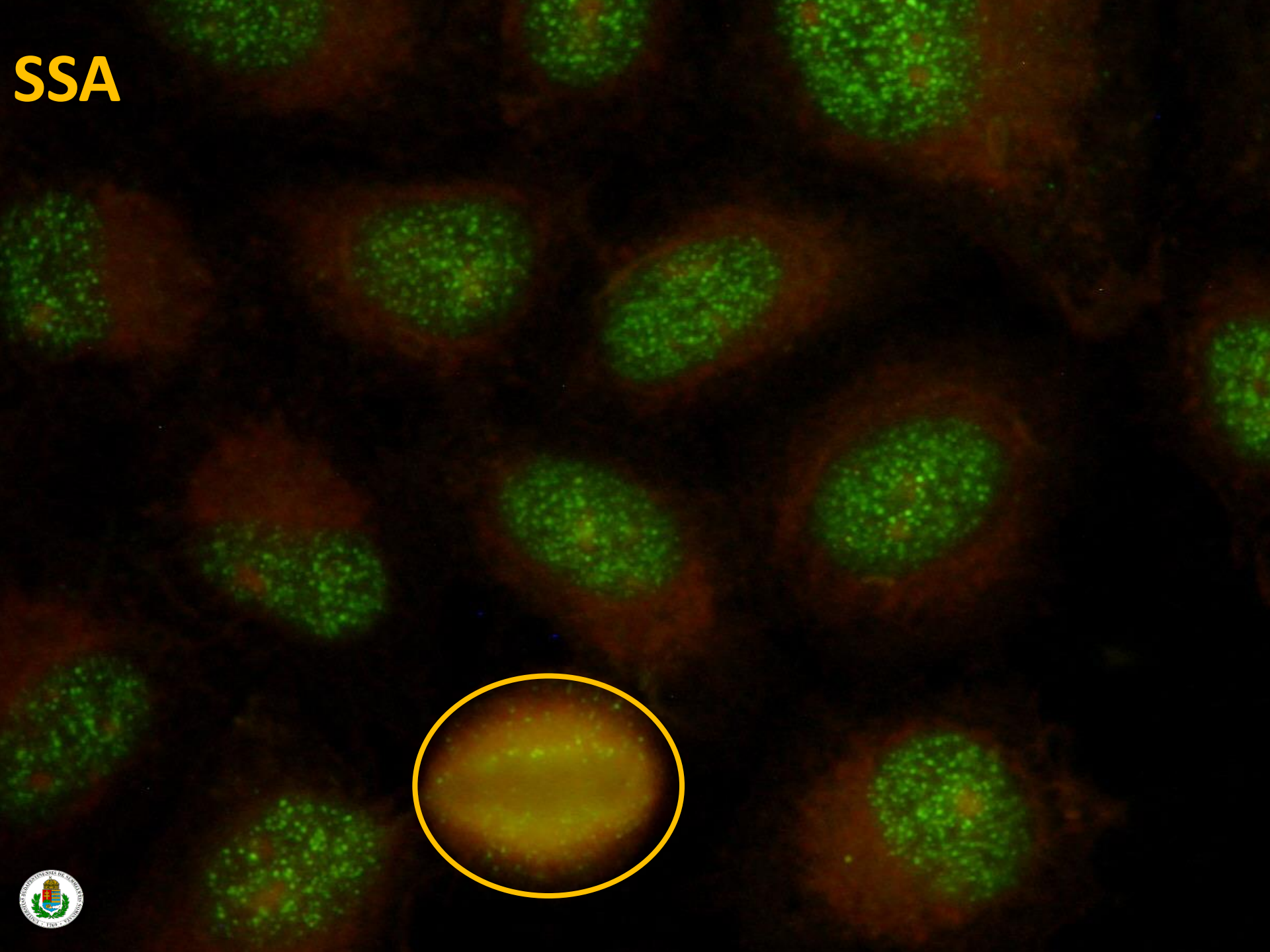
ENA ist eine Untergruppe des ANA

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

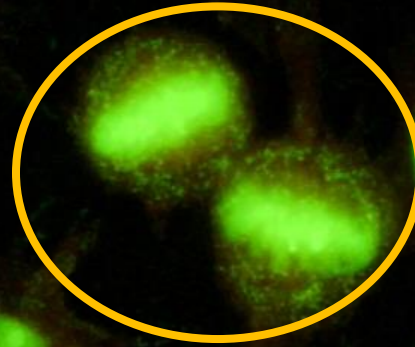


SSB

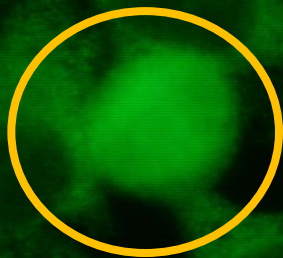


RNP/Sm

ScL-70



Jo-1



50um

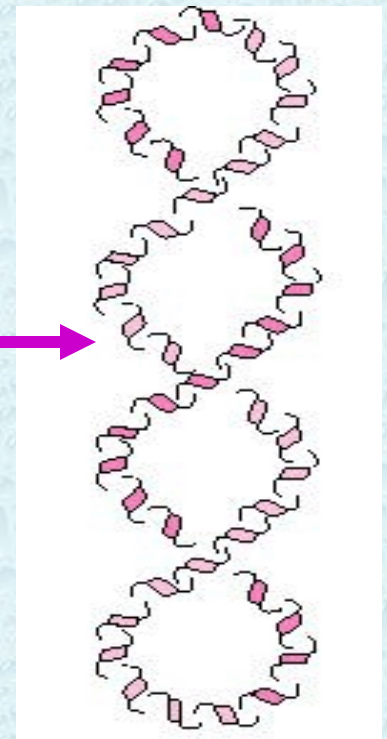
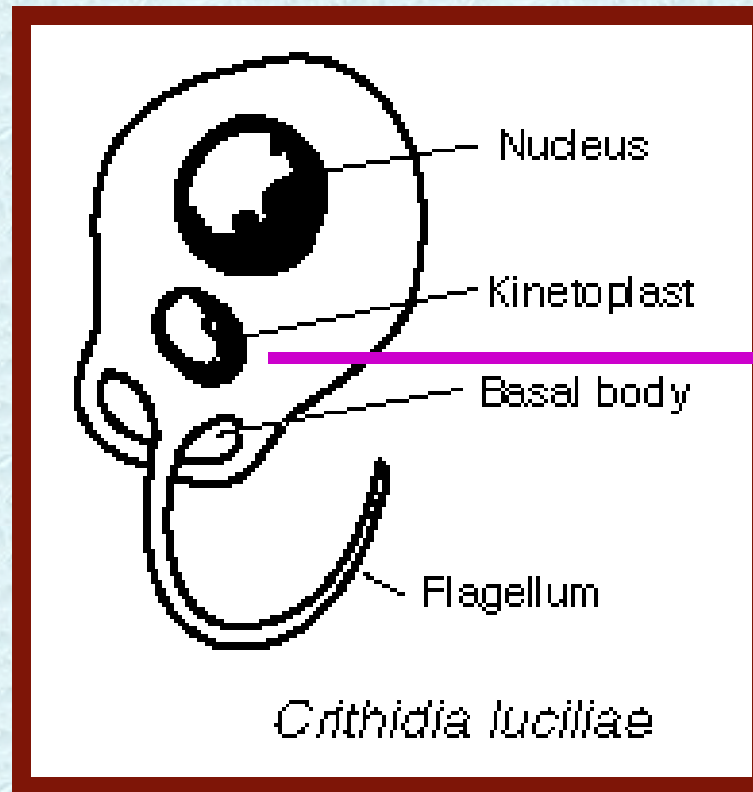
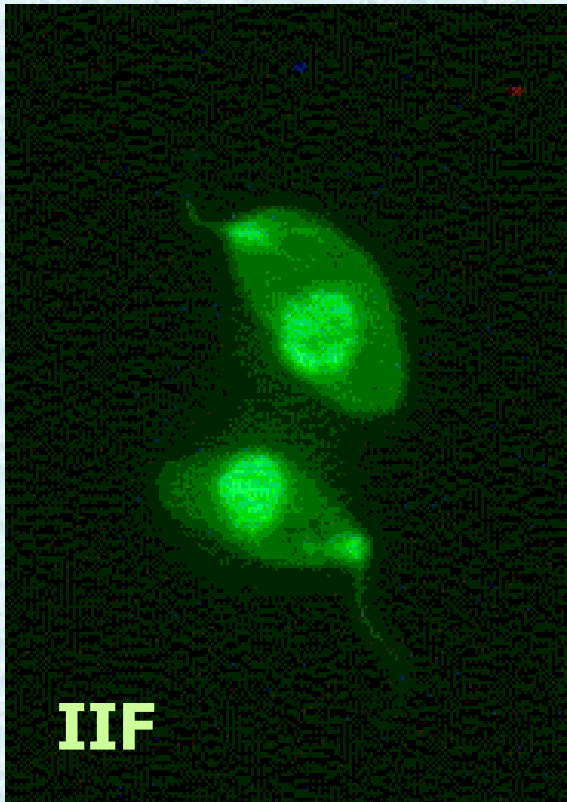


Anti-dsDNS – ist kein
ENA

anti-Doppelstrang DNS (dsDNS)

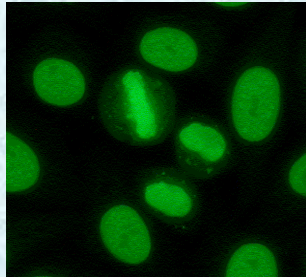
- **SLE**
- **Drug-induziertes SLE (anti-Histon)**
- **Autoimmunhepatitis Typ I**
- **Juvenile Idiopathische Arthritis**

Crithidia luciliae

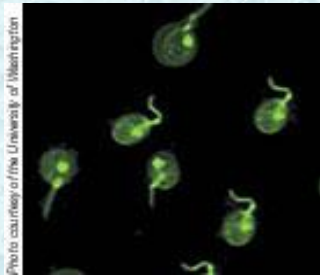


Flagellate - Kinetoplast reine *zirkuläre* Doppelstrang-DNA

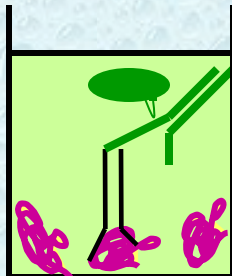
Verschiedene Screening Methoden für dsDNS bei SLE Patienten



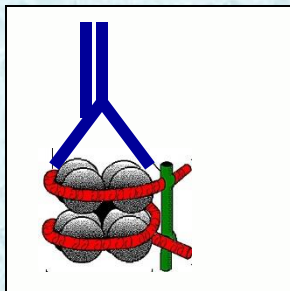
HEp-2
IIF



Crithidia IIF



ELISA
dsDNS
(Nukleosome)



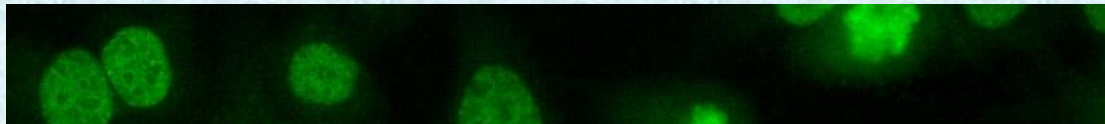
Farr-
Assay

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

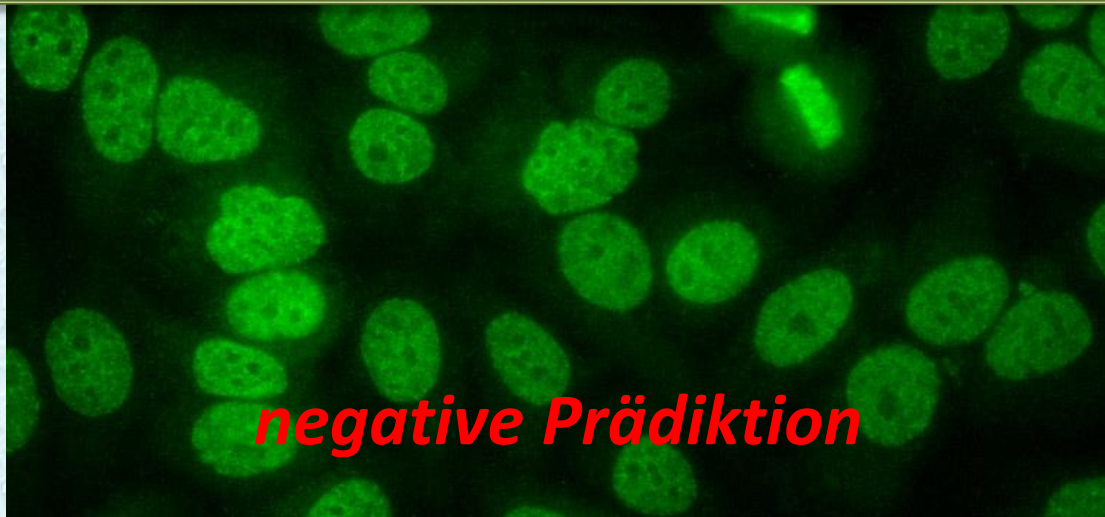
ANA Positivität

ist Kennzeichnung einer systemischen autoimmun-
rheumatischen Erkrankung

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



es ist nicht alles Gold, was glänzt





www.ANApatterns.org

E.K.L. Chan, J. Damoiseaux, O.G. Carballo, K. Conrad, W. de Melo Cruvinel, P.L.C. Francescantonio, M.J. Fritzler, I. Garcia-De La Torre, M. Herold, T. Mimori, M. Satoh, C.A. von Mühlen, and L.E.C. Andrade.

Report of the First **I**nternational **C**onsensus on
Standardized Nomenclature of **A**ntinuclear Antibody
HEp-2 Cell **P**atterns (ICAP) **2014-2015**

Front. Immunol. 2015, Aug 20;6:412

HEp-2 cell patterns

Nuclear

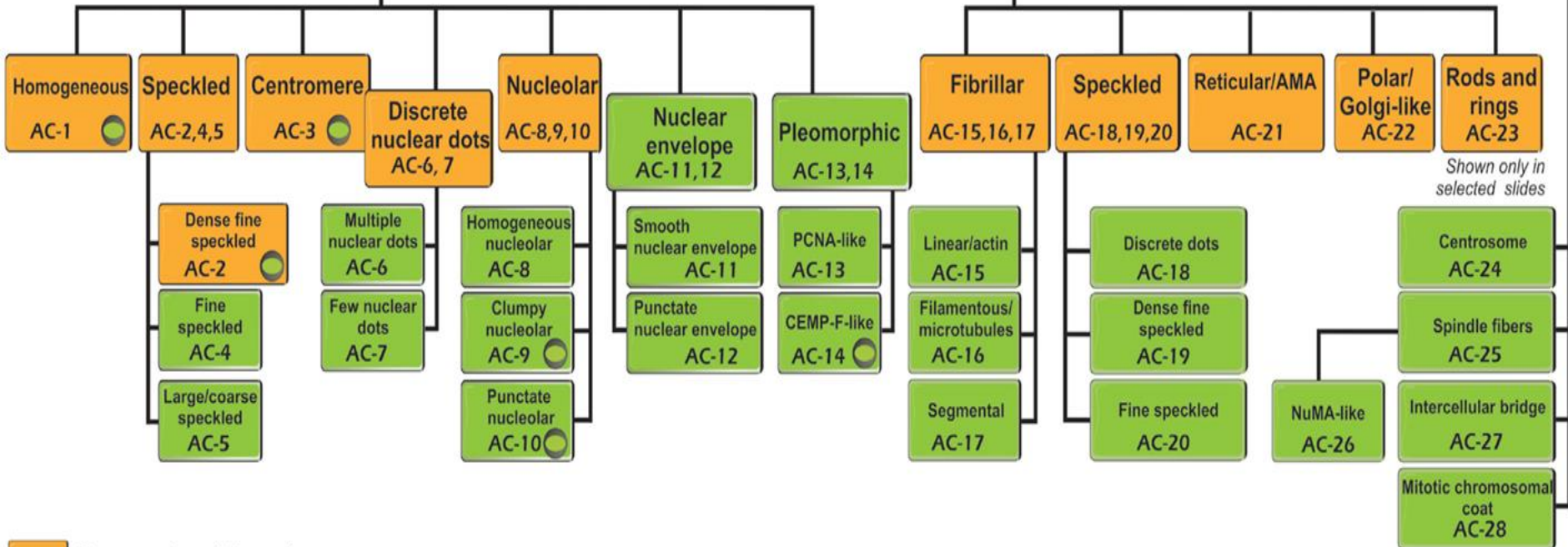
AC-1 to AC-14

Cytoplasmic

AC-15 to AC-23

Mitotic

AC-24 to AC-28



Competent-level

Expert-level report

Metaphase plate is stained

Autoimmunvaskulitiden

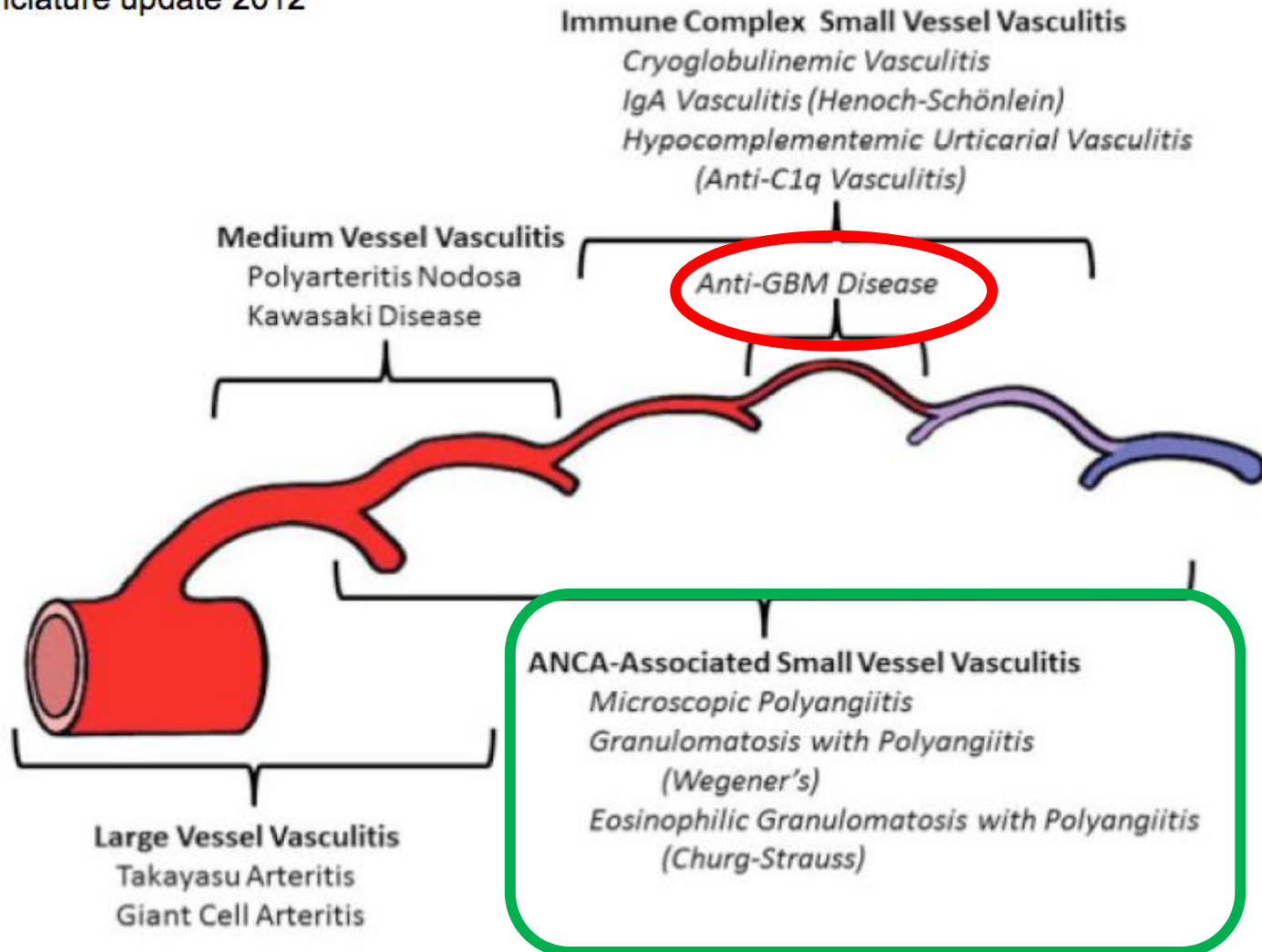
ANCA-assoziierte Vaskulitiden
(Anti-Neutrophile
Zytoplasmatische Antikörper)

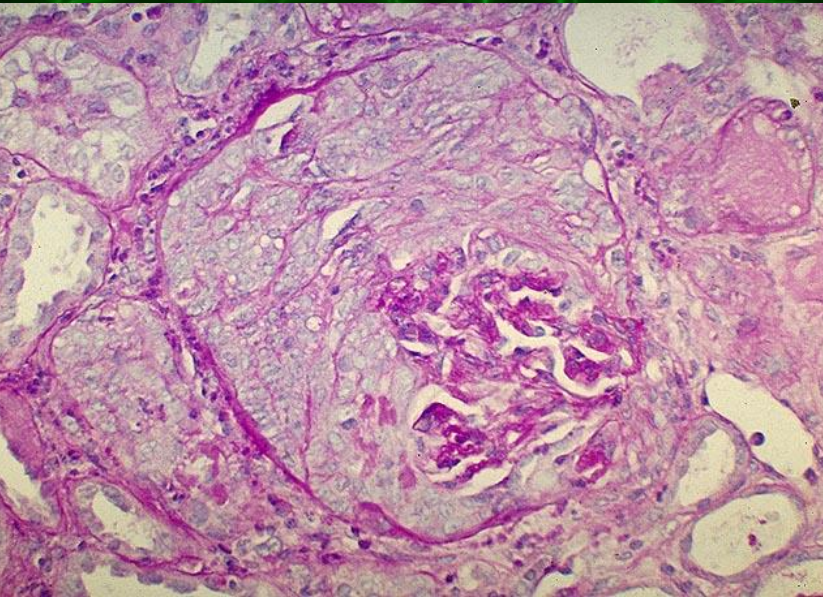
Einteilung der primären Vaskulitiden entsprechend der Chapel-Hill Klassifikation

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



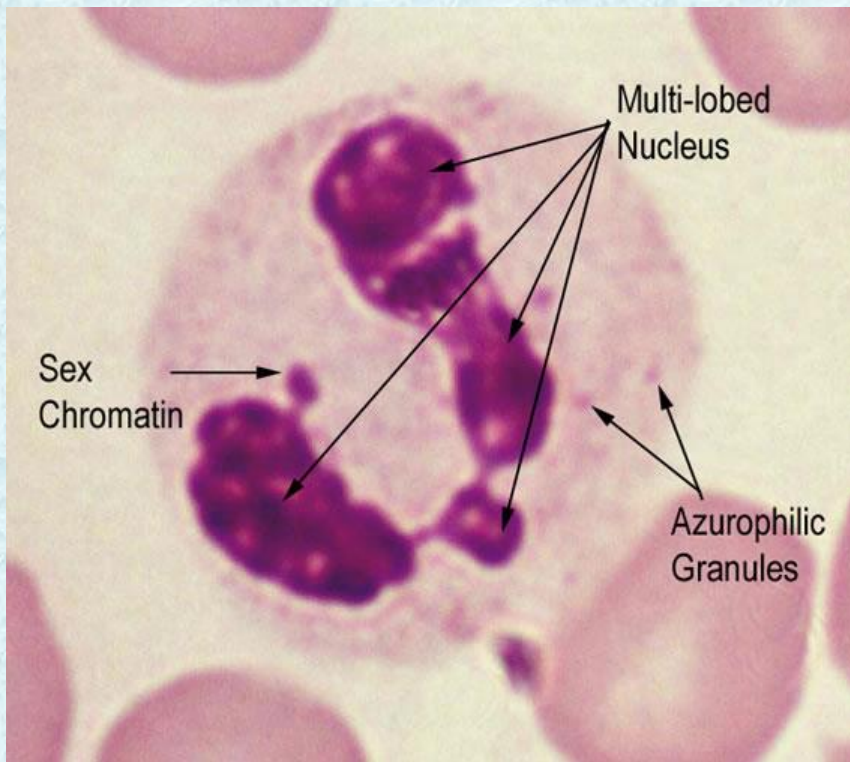


Goodpasture-Syndrom anti-GBM-Syndrom

**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**

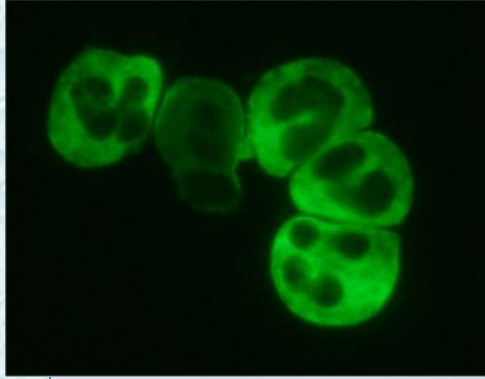
BPI (bactericidal permeability increasing protein)

Elastase

Cathepsin G

Spezifische Körperchen: Lactoferrin

c-ANCA - p-ANCA



Indirekte Immunfluoreszenz:
zytoplasmatische Reaktion

Immunoassay
Antigenspezifität :

Proteinase 3
(PR3-ANCA)

Wegener'sche Granulomatose
(50 –95 %)



Indirekte Immunfluoreszenz:
perinukleäre Reaktion

Immunoassay
Antigenspezifität :

Myeloperoxidase
(MPO-ANCA)

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

(EtOH)

50um

c-ANCA

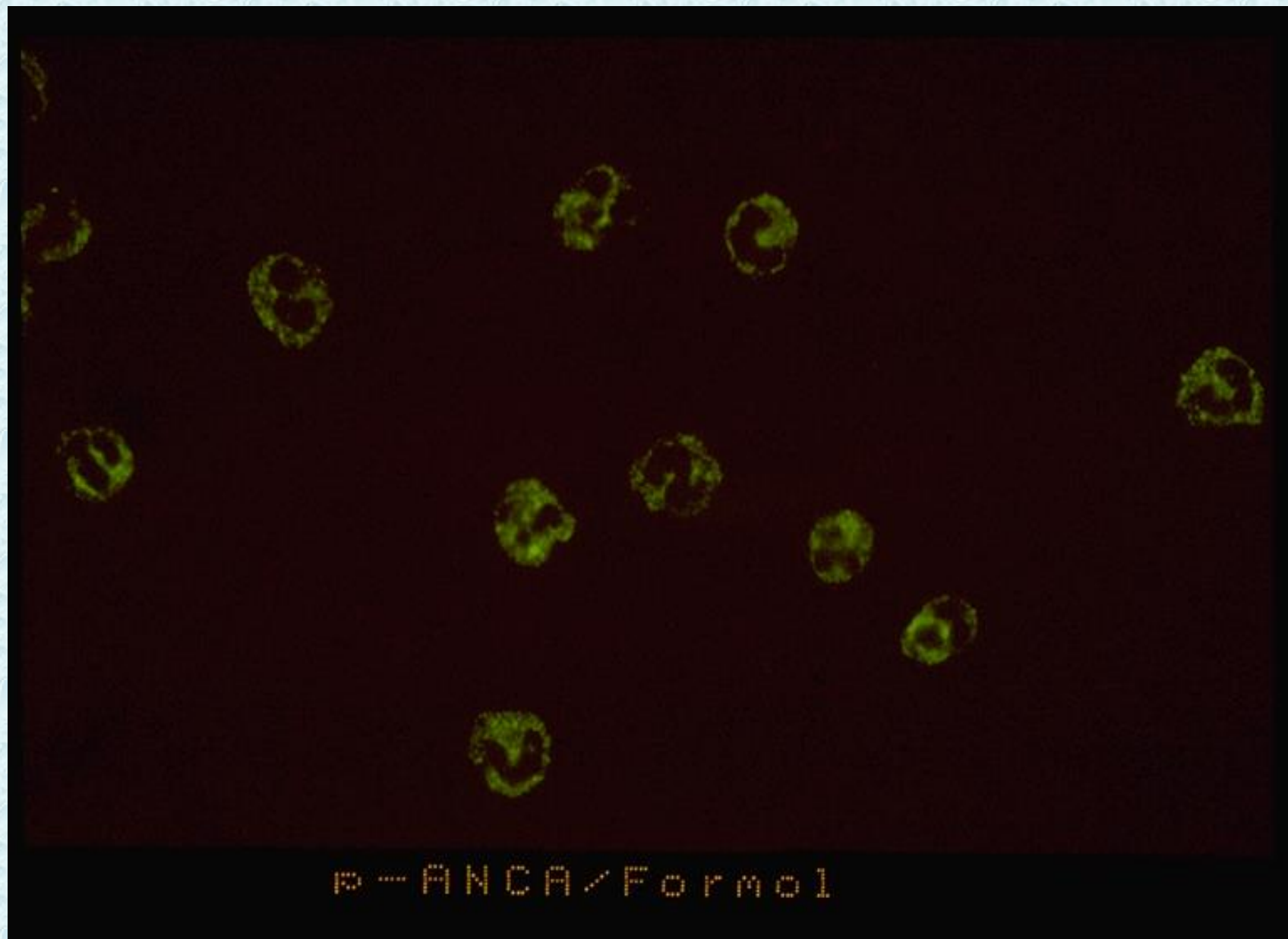


(EtOH)

50um

p-ANCA



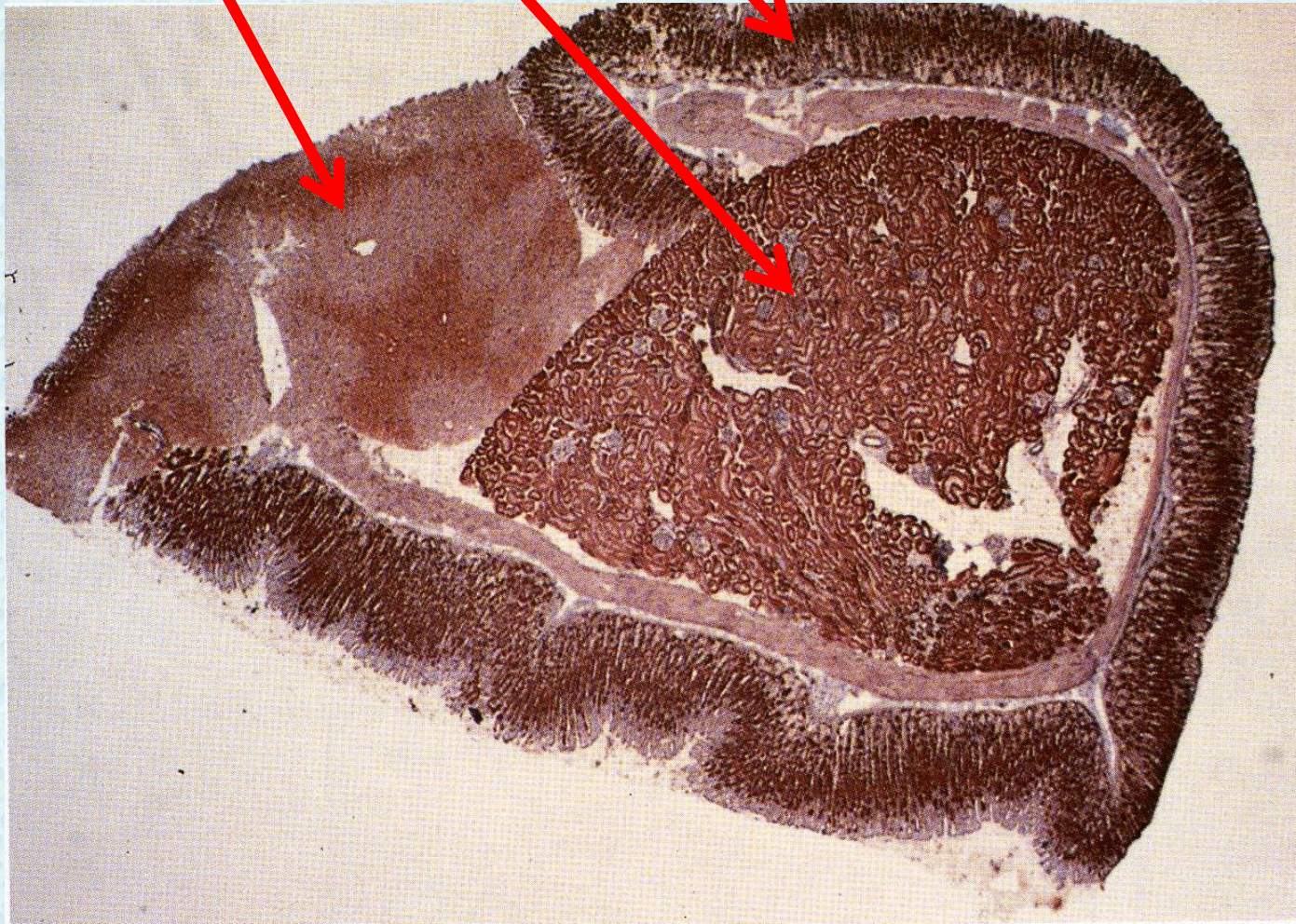


p-ANCA/Formol

Gewebespezifische Autoantikörper

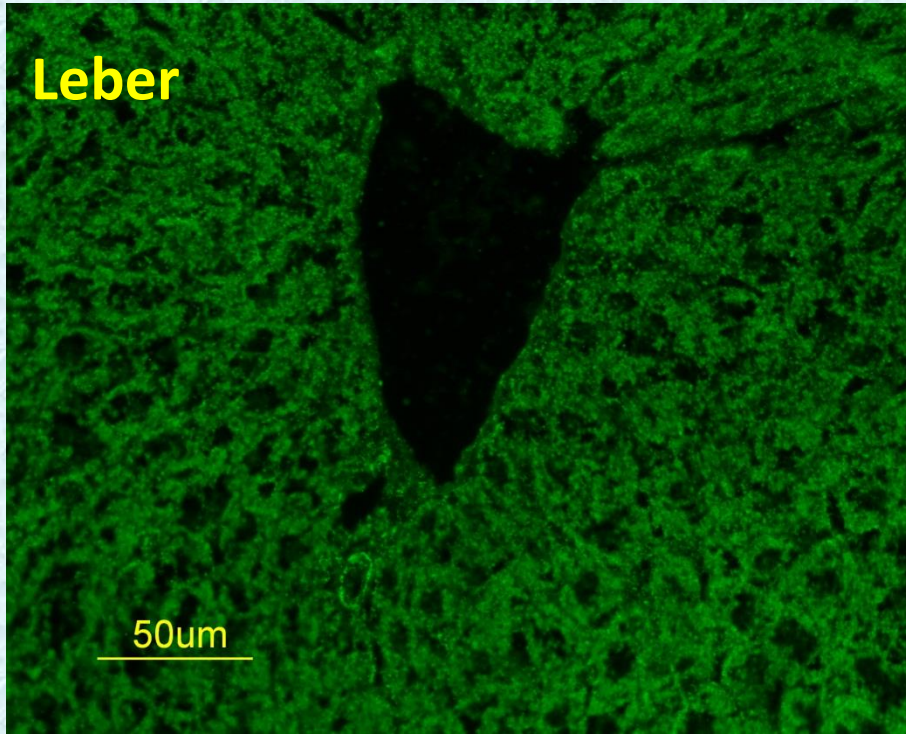
Autoimmun-hepatobiliäre Erkrankungen

Leber/Niere/Magen Substrat (Liver/Kidney/Stomach = LKS)

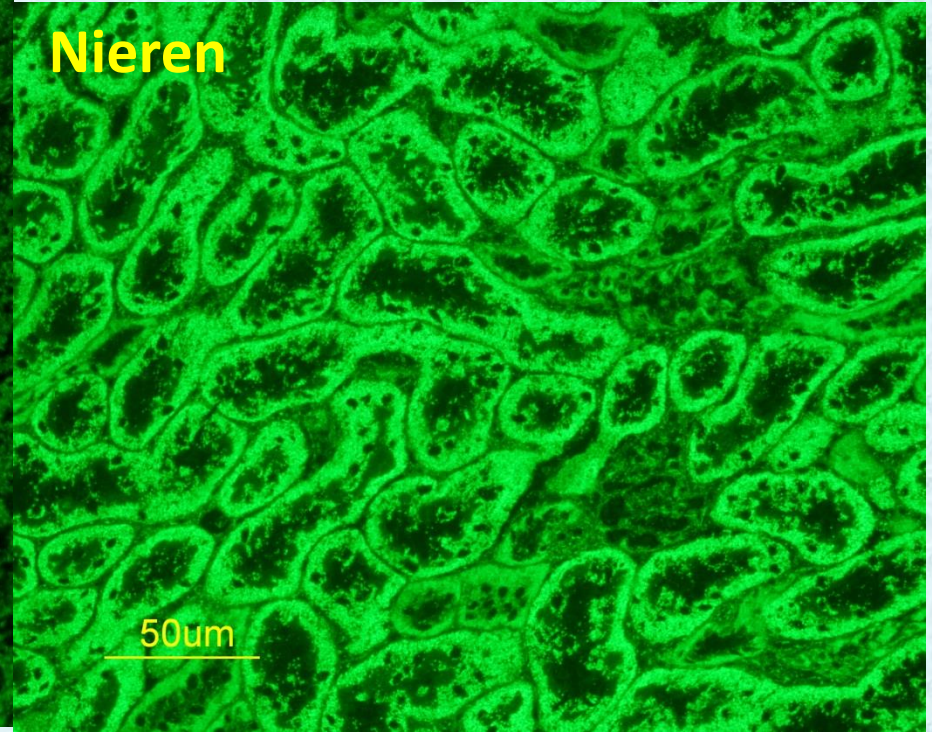


antimitochondriale Antikörper - *Primär biliäre (Zirrhose) Cholangitis*

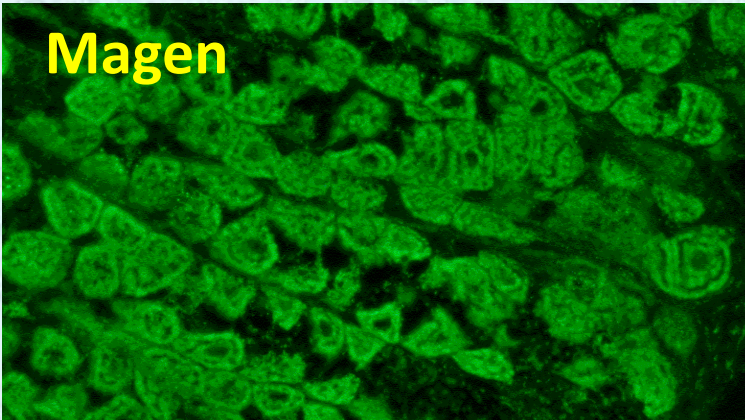
Leber



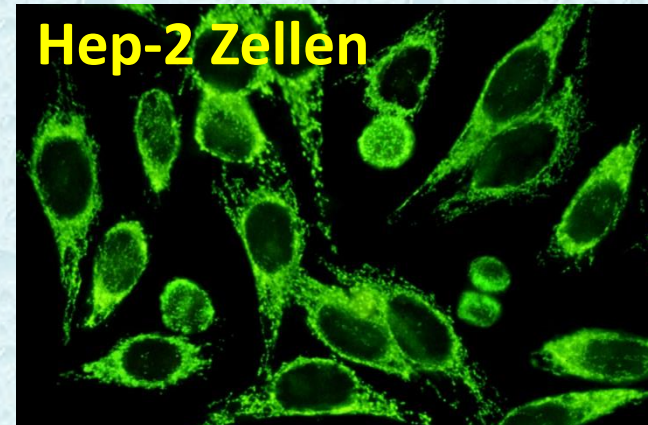
Nieren



Magen

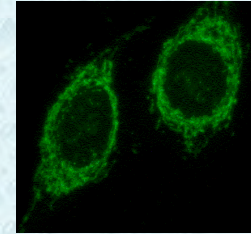


Hep-2 Zellen



Bewertung der Autoantikörper

- prädiktive

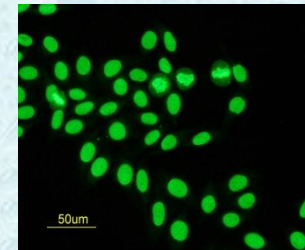


antimitochondriale Antikörper bei PBS

- präventive

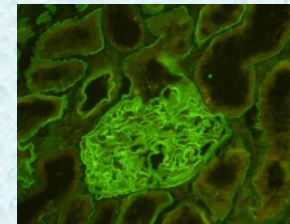
natürliche Autoantikörper

IgM anti-dsDNS bei SLE



- pathogen

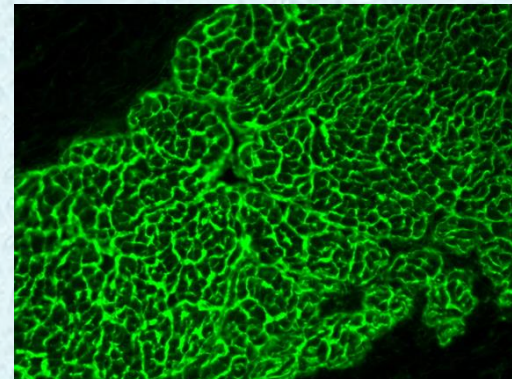
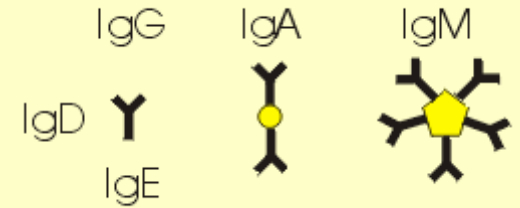
anti-GBM Antikörper bei Goodpasture-Syndrom



Verlaufsparmeter

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



Körperflüssigkeit für eine Autoantikörperbestimmung

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

Ende

