*Auto*immunerkrankungen, *Auto*immundiagnostik, *Auto*antikörper

12. Juni 2013, 15:00 Uhr

Dr. rer. nat. Brit Kieselbach

Was ist eine Autoimmunerkrankung ?

- chronisch entzündlicher Prozess
- systemisch oder organbezogen

Ursache: überschießende Reaktion des Immunsystems
gegen körpereigenes, gesundes Gewebe (Autoantigene)
(Autoantikörper u./o. spezifisch sensibilisierte Lymphozyten)
Toleranzverlust

Folge: Entzündungsreaktionen, die zur Zerstörung der
betroffenen Organe und bei schwerem Verlauf mit
Systembeteiligung zum Tod führen

Autoimmunerkrankungen....

- treffen bevorzugt das weibliche Geschlecht
  (gehören zu den 10 häufigsten Todesursachen bei Frauen)
- Beginn oft im Kindes- /Jugendalter
- zunehmende Prävalenz (in der westlichen Welt)
- gehen mit Bildung von diagnostisch relevanten Autoantikörpern einher
- oft große Variabilität in den klinischen Manifestationen und langes präklinisches Stadium
- in vielen Fällen oft Jahre zwischen Erstsymptomen und Diagnose
- Frühdiagnose für positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs äußerst wichtig!
- bisher keine kausale Therapie

Prävalenz

- betroffen sind ca. 5 % der Gesamtbevölkerung

  (Tendenz steigend in Ländern mit westlichem Lebensstil)
- häufigste Autoimmunerkrankungen:
  - autoimmune Schilddrüsenerkrankungen
  - Rheumatoide Arthritis (RA)
  - Anti-Phospholipid-Syndrom (APS)
  - autoimmune Lebererkrankungen
  - Diabetes mellitus Typ 1

Grundprinzip der „Autoaggression“

Das Immunsystem richtet sich:

1. gegen das gesamte System (multiple Organe)

→ systemische Erkrankung

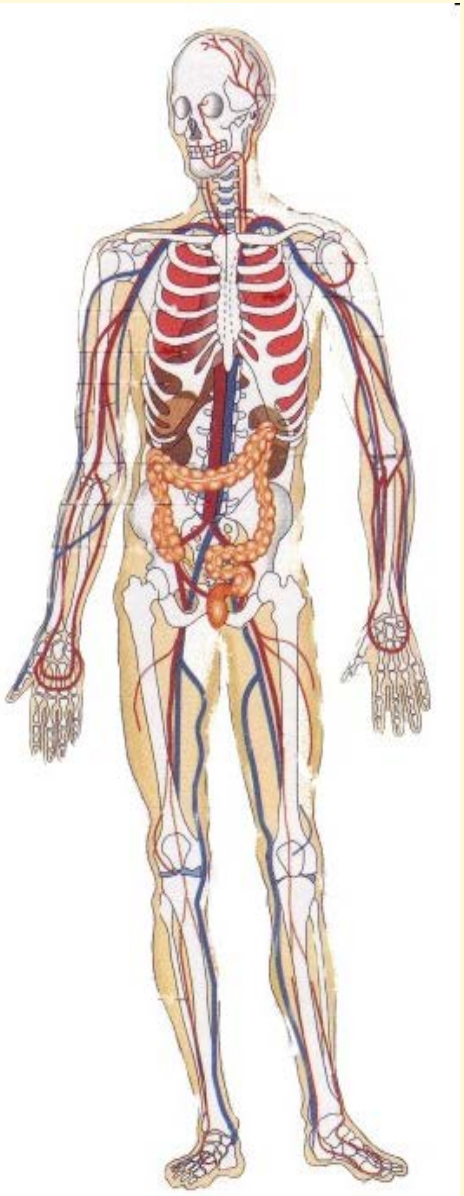
2. gegen ein einzelnes Organ

→ organspezifische Erkrankung

organspezifische Erkrankungen

Immunreaktion ausschließlich gegen spezifische Antigene eines Organs bzw. Organsystems gerichtet, z.B.:

- Schilddrüse
  (Hashimoto-Thyreoiditis)
- Magen
  (perniziöse Anämie)
- Nebenniere
  (Morbus Addison)
- Pankreas
  (Diabetes mellitus Typ 1)



systemische Erkrankungen

Immunreaktion gegen verschiedene Körpergewebe mit Ablagerung von Immunkomplexen in v.a.:

- Gelenken
  (Rheumatoide Arthritis)
- Niere
  (SLE, M. Wegener)
- Haut
  (SLE, Sklerodermie)
- Lunge
  (M. Wegener, Sklerodermie)

> 80 verschiedene Autoimmunerkrankungen!

Quelle: W.Schößler, K.Conrad

Ursachen von Autoimmunerkrankungen

- Störung des lebenserhaltenden immunologischen Gleichgewichts

- Ursachen sind sehr komplex und nur teilweise geklärt
  multikausal !

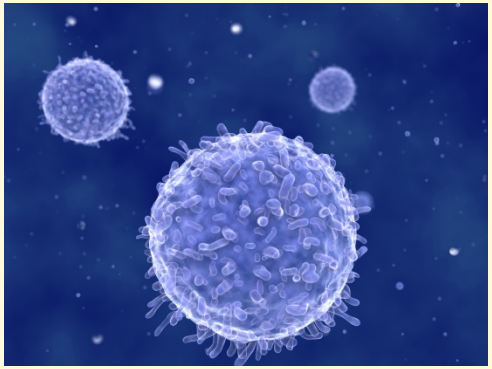
- Immundefekte (IgA-, C1q-, C2-, C4-Defizienz)
- exogene Faktoren, z.B. :
  - Viren, Bakterien, Parasiten
  - Medikamente, chem. Noxen, Stress
  - Umweltschadstoffe
  - immunologische Sondersituation, z.B. Schwangerschaft
- genetische Faktoren (Zwillingsforschung: nur in 20-50% der Fälle Assoziation, nicht 100%!)
- Alter (jung <3% $\Longleftrightarrow$ >70 Jahre >30%)
- Geschlecht (weiblich > männlich; Hormoneinfluss)
- Begleiterkrankung bei Malignomen

Autoimmunerkrankungen werden vermittelt durch...

...autoreaktive B-Zellen via AAk (humorale Abwehr)

z.B.
- Myasthenia gravis
- M. Basedow
- Goodpasture-Syndrom

...autoreaktive T-Zellen (zelluläre Ebene)



z.B.
Diabetes mellitus Typ 1
Rheumatoide Arthritis
Autoimmunhepatitis

Zelluläre Elemente des Immunsystems

unspezifisches Immunsystem (angeboren, nicht lernfähig)	**spezifisches Immunsystem** (erworben, lernfähig)
Monozyten **→ Gewebemakrophagen** **Granulozyten** **- Neutrophile (PMN)** **- Eosinophile** **- Basophile** **Mastzellen** **Natürliche Killerzellen**	**- T-Lymphozyten** **- B-Lymphozyten** **Antikörper /** ***Auto*antikörper**

Was sind Autoantikörper (AAk) ?

= Antikörper gegen *Auto*antigene („selbst“)

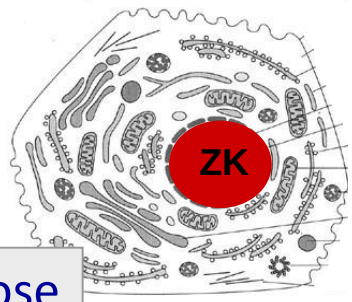
	natürliche	**pathologische**
Expression:	•bei Geburt	•bei Autoimmunerkrankung
Isotyp:	•IgM	•IgG
Konzentration:	•niedrig	•hoch
Affinität:	•gering	•hoch
Vorkommen:	•bei Gesunden	•Autoimmunerkrankung

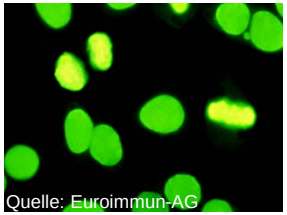
Pathologische Autoantikörper richten sich gegen:

1. Zellbestandteile aller Zellen von allen Organen (systemisch)

2. bestimmte Organe (organspezifisch)

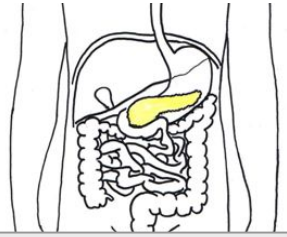
ANA (Anti-Nukleäre Antikörper)

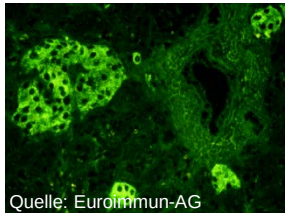




Kollagenose

z.B. **AAk gegen Inselzellen** des Pankreas



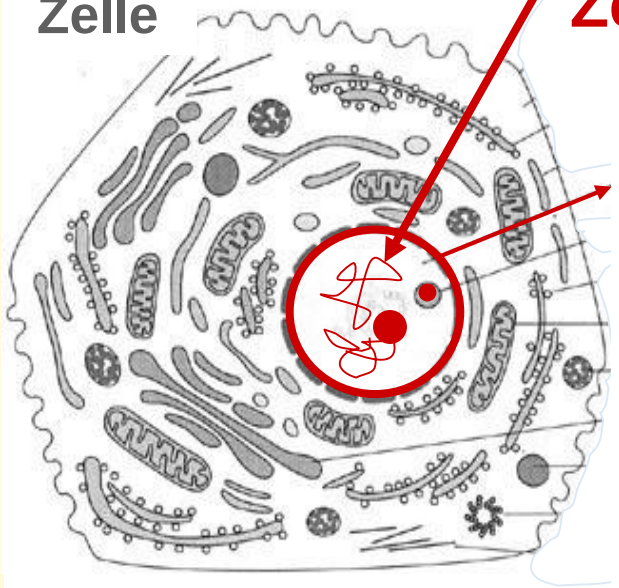


Diabetes m. Typ 1

Was erkennen ANA?

intrazelluläre Bestandteile jeder Zelle
= nicht-organspezifisch

Zelle

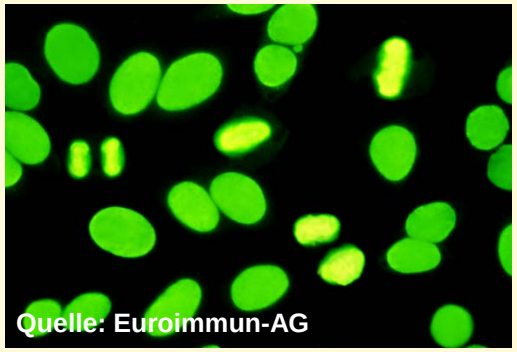


Zellkern (Nukleus)

z.B.

- **Nukleinsäuren (z.B.dsDNA)**
- **DNA-assoz.Proteine (z.B. Centromere, Histone)**
- **Kernkörperchen (Nucleolus)**
- **Enzyme (z.B. RNA-Polymerasen, DNA-Topoisomerasen)**
- **Kernmembran**

Blutsenkungsgeschwindigkeit (1.Std.)	**33**	mm	< 20
CRP i.S. (Turb.)	**10.2**	mg/l	< 5.0
ANA (Antinukleäre Ak) i.S. (IFT)	**1:32000**		< 1:100
Fluoreszenzmuster: homogen/granulär/centromer			
dsDNA-AAk i.S. (ELISA)	**549**	IE/ml	< 100
nDNA-Ak (Crithidie) i.S. (IFT)	**1:1280**		< 1:10



Positiver ANA in der IFT…

Zielantigen ?

Doppelstrang-DNA (dsDNA)

ANA- / dsDNA-AAk-Interpretation:

Autoantikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) nachweisbar. dsDNA-AAk gelten als Markerantikörper für den systemischen Lupus erythematodes (SLE), v.a. bei Bestätigung durch den nDNA-Crithidien-IFT.
Sie treten besonders bei aktivem SLE mit Nierenbeteiligung auf (95%). Für eine Kontrolle des Krankheitsverlaufs wird der dsDNA-ELISA empfohlen, da die Konzentration mit der Aktivität der Erkrankung korreliert.

-Klinisches Bild ist entscheidend !
-Labordiagnostisch: Hinweis auf systemischen Lupus erythematodes
-Verlaufskontrolle nach ca. 6 Monaten

Was erkennen organspezifische AAk?

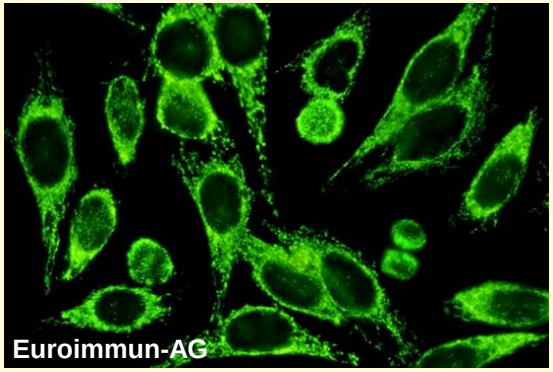
- **intrazelluläre Bestandteile**
  (z.B. Mitochondrien = AMA)
- **membranständige Antigene**
  (Rezeptoren, z.B. Acetylcholin-, Insulin-, TSH-Rezeptor)
- **extrazelluläre Bestandteile**
  (Hormone, z.B. Insulin)

ANA (anti-nukleäre Ak) i.S. (IFT)	< 1:100	< 1:100
SS-A (Ro)-AAk i.S. (ELISA)	negativ	negativ

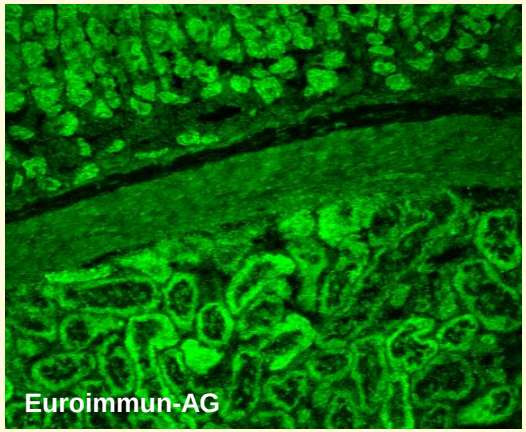
ANA-Interpretation:
Kein Hinweis auf antinukleäre Antikörper (ANA).

AMA (anti-mitochondriale Ak) i.S.	**1:800**	< 1:50

AAK gegen Mitochondrien können bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden. Besonders zur Diagnose der primär-biliären Leberzirrhose (PBC) ist die Bestimmung der M2-AMA von Bedeutung.
Wir empfehlen zur weiterführenden Diagnostik: M2-AMA.



ANA negativ, Zytoplasma positiv: AMA- Verdacht



AMA auf Gewebeschnitt bestätigt

Klinische Bedeutung von krankheitsspezifischen Autoantikörpern

1.Diagnostik	Diagnosesicherung, auch wenn Klassifikationskriterien nicht erfüllt sind
	Diagnosesicherung bei seltenen Manifestationen oder atypischen Verlaufsformen
2.Risikodiagnostik/ Prognostik	Vorhersage/ Risiko einer Krankheits-entwicklung und des Krankheitsverlaufes (z.B. GAD-AAk, CCP-AAK, M2-AMA)
3.Monitoring	Verlaufskontrolle der Krankheitsaktivität (z.B. dsDNA-, PR3-AAk)

Quelle: W.Schößler, K.Conrad, F.Hiepe

Autoimmundiagnostik steht nicht allein...

Diagnosefindung:

- **Anamnese**
- **Bildgebung**
- **Labordiagnostik**

  - klinische Chemie,

  Immunologie (Entzündung?)

  - Bestimmung von Autoantikörpern (AAk)
  (Stufendiagnostik ⟺ one-step-Diagnostik)

  - Histologie

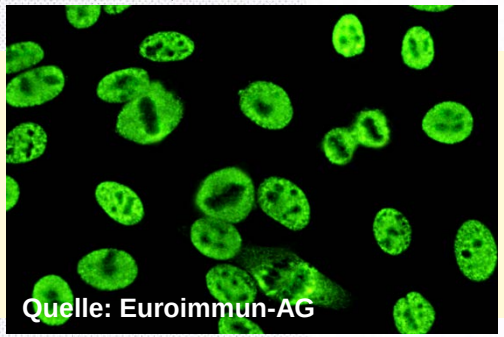
Quelle: K.Conrad

Vorteile der Stufendiagnostik

- Kosteneffektives Screening auf die Mehrzahl klinisch relevanter AAk (ANA, ENA-AAk)

d.h.
statt z.B. gezielt AAk gegen SS-A erst die Suchteste anfordern:
1. ANA
2. ENA-AAk-Screening

ANA (Antinukleäre Ak.) i.S. (IFT)	1:10000	< 1:100
Fluoreszenzmuster: granulär		
ENA-Pool Screening i.S. (EIA)	positiv	negativ
Der Test erfasst: RNP/Sm, Sm, SS-A(Ro), SS-B(La), Scl-70, Jo-1		



Automatische ENA-AAk-Differenzierung:

ENA-Auftrennung (Blot)		
SS-A (Ro) Ak i.S.	negativ	negativ
SS-B (La) Ak i.S.	negativ	negativ
nRNP Ak i.S.	stark positiv	negativ
Sm-Ak i.S.	negativ	negativ
Scl-70 Ak i.S.	negativ	negativ
Jo-1 Ak i.S.	negativ	negativ

Interpretation antinukleäre AAk

Positive ANA sind typisch bei Kollagenosen, können jedoch auch bei anderen entzündlichen rheumatischen Erkrankungen und fast allen anderen Autoimmunerkrankungen auftreten.

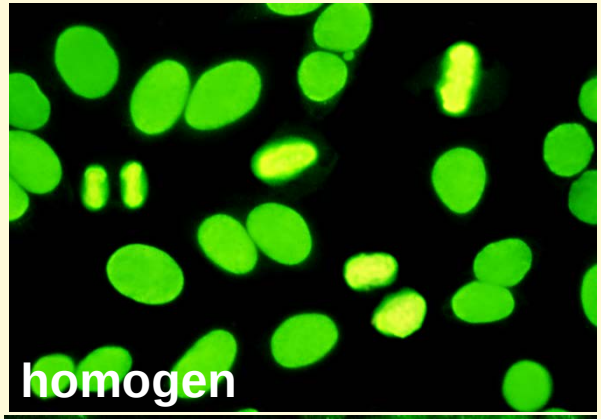
In der ANA-Differenzierung wurden Autoantikörper gegen nRNP nachgewiesen. Sie sind charakteristisch für die Mischkollagenose (MCTD, Sharp-Syndrom) mit einer Spezifität von fast 100%. Der Ak-Titer korreliert mit der Krankheitsaktivität. nRNP-AAk können auch mit SLE (ca. 30%; meist mit AAK gegen Sm kombiniert) oder Sklerodermie (bis 10%) assoziiert sein.

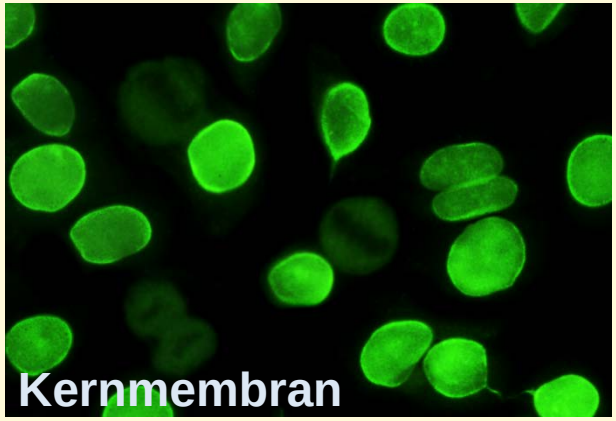
Vorteile der Stufendiagnostik

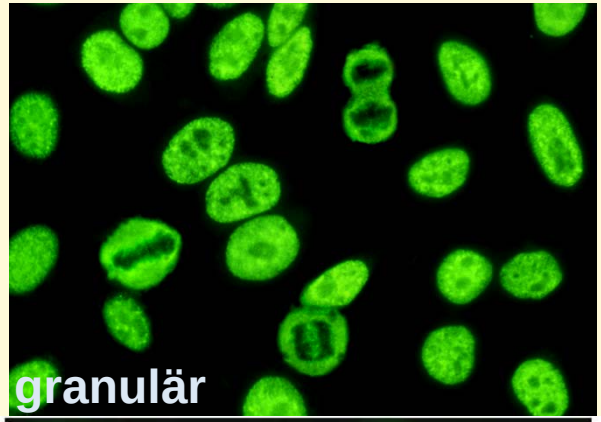
- Kosteneffektives Screening auf die Mehrzahl klinisch relevanter AAk

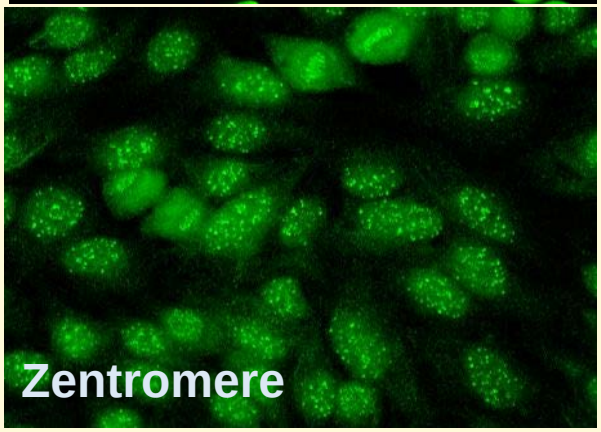
- Optimale Auswahl der Folgetestungen mittels Differenzierung der Fluoreszenzmuster (z.B. ANA)

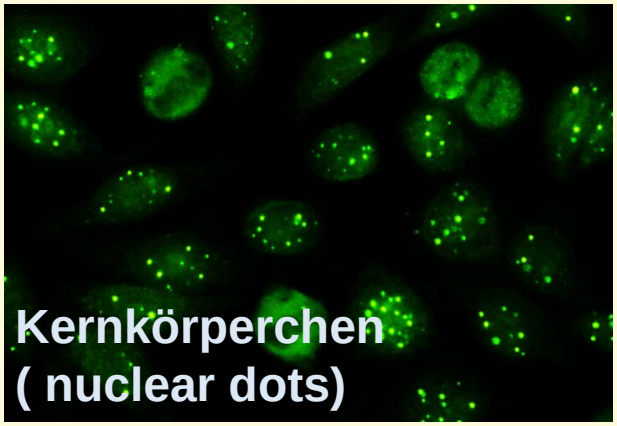
9 verschiedene Patienten = 9 verschiedene „ANA“-Muster

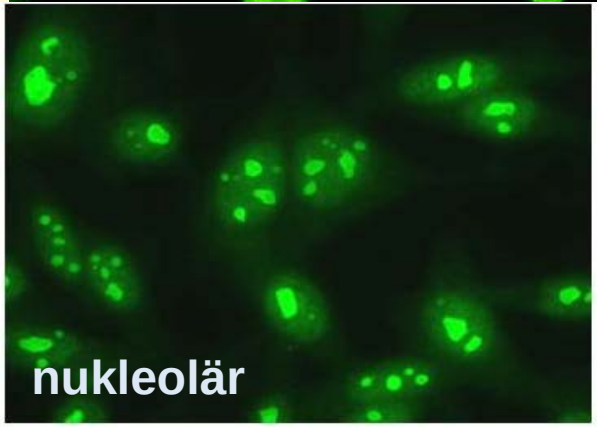


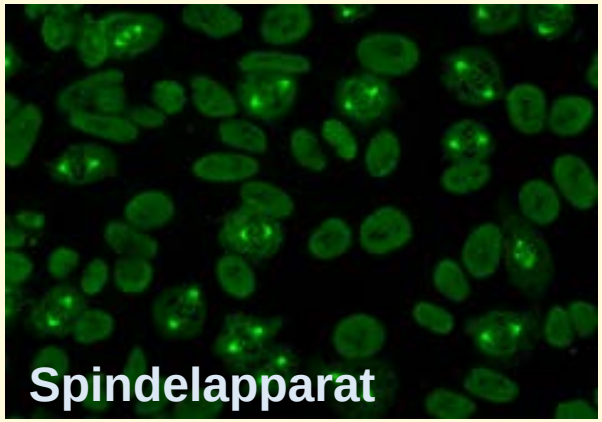


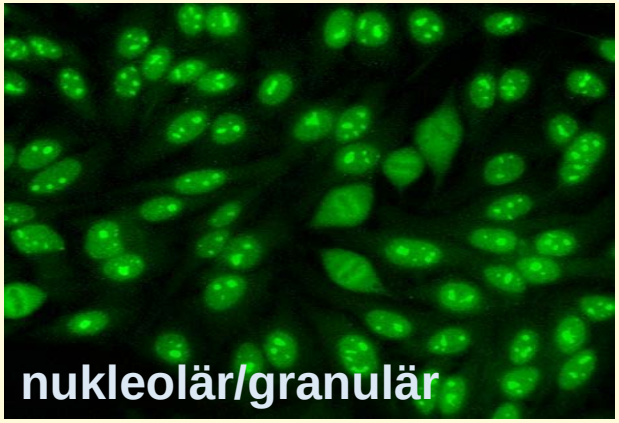


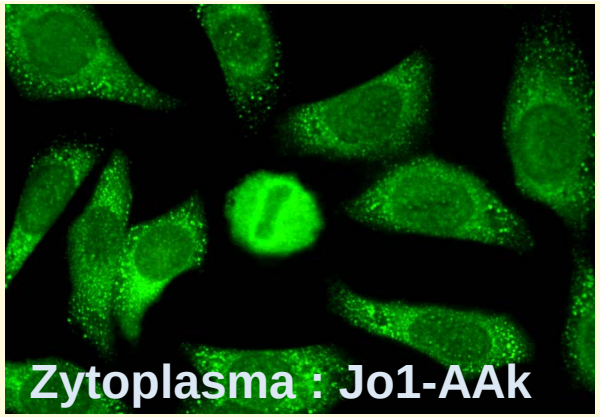






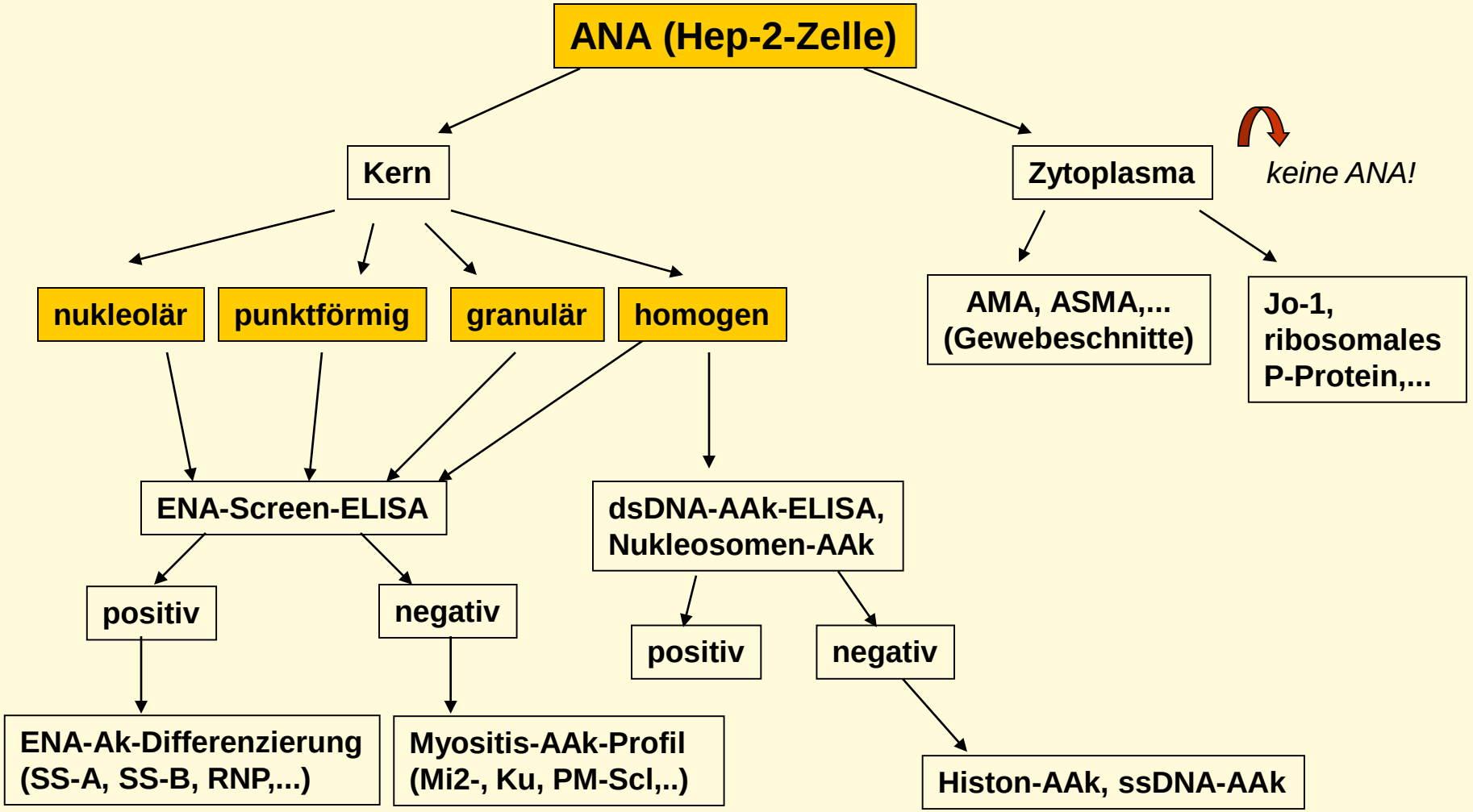






Quelle: Euroimmun AG

ANA-Differenzierung:



Vorteile der Stufendiagnostik

- Kosteneffektives Screening auf die Mehrzahl klinisch relevanter AAk
- Optimale Auswahl der Folgetestungen mittels Differenzierung der Fluoreszenzmuster
- Bestimmung von AAk-Spezifitäten anhand spezifischer Muster (z.B. Haut-AAk)

Material:

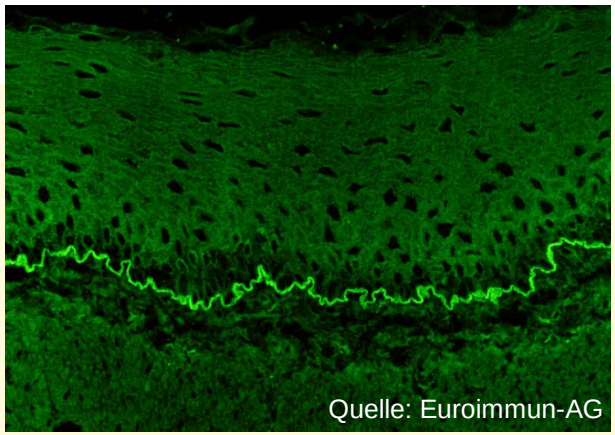
Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Information	-folgt-		
Pemphigus Ak i.S. (IFT) (Antikörper gegen Stachelzell-Desmosomen)	negativ		negativ
Pemphigoid Ak i.S. (IFT) (Antikörper gegen epidermale Basalmembran)	**positiv**		negativ

Nachweis von Pemphigoid-AAk.
AAk gegen die epidermale Basalmembran (Pemphigoid) sind charakteristisch für das bullöse Pemphigoid, dem Herpes gestationes und das vernarbende Schleimhautpemphigoid.
Als Bestätigungstest empfehlen wir die Bestimmung der BP180-AAk und der BP230-AAk.

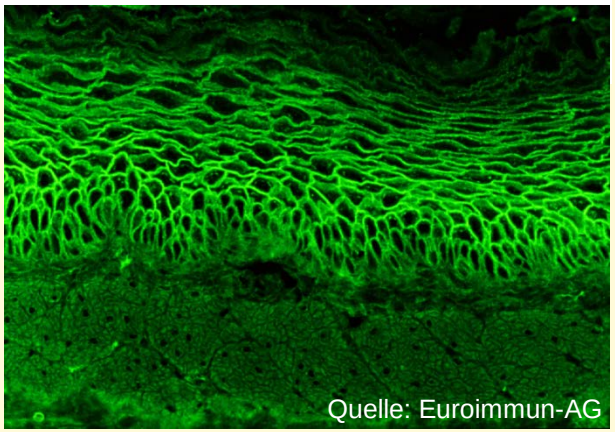
Ak gegen BP230 i.S.° (ELISA)	**48**	E/ml	< 20
Ak gegen BP180 i.S.° (ELISA)	**22**	E/ml	< 20

Positive AAk gegen BP230 und BP180 sind besonders für das bullöse Pemphigoid charakteristisch.

Dieser Befund wurde freigegeben von Herrn Dr.med.V.von Baehr



Pemphigoid-AAk



Pemphigus-AAk

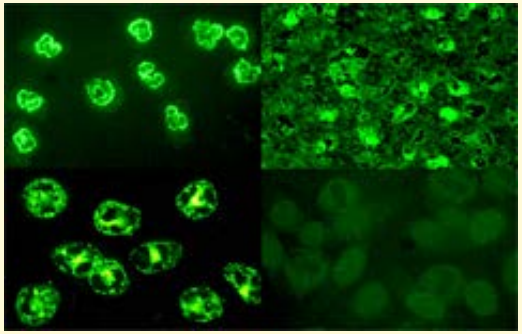
Vorteile der Stufendiagnostik

- Kosteneffektives Screening auf die Mehrzahl klinisch relevanter AAk
- Optimale Auswahl der Folgetestungen mittels Differenzierung der Fluoreszenzmuster
- Bestimmung von AAk-Spezifitäten anhand spezifischer Muster
- Screening auf AAk-Spezifitäten, für die aktuell keine spezifischen Teste zur Verfügung stehen

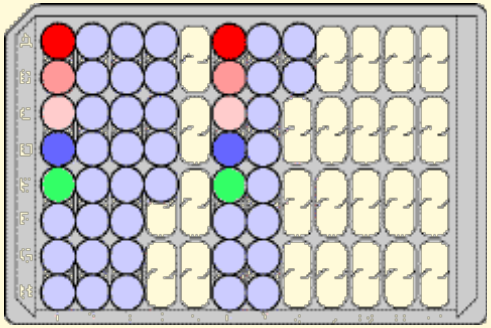
AAk-Nachweis – wichtigste Methoden

1. **Indirekte Immunfluoreszenz (IFT)**
2. **Enzymimmunoassay (ELISA)**
3. **Immunoblots/ Lineassay**

IFT



ELISA



Immunoblot

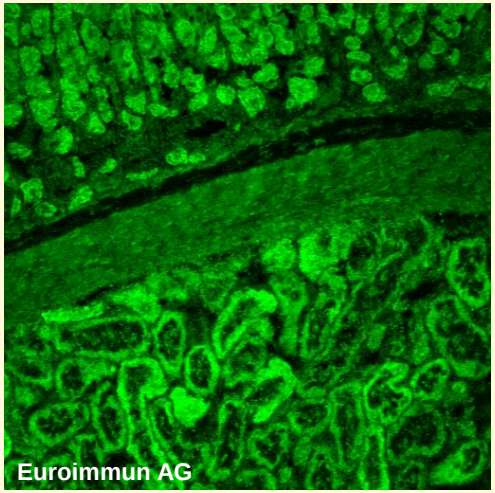
Quelle: Euroimmun-AG

Indirekte Immunfluoreszenztechnik (IFT)

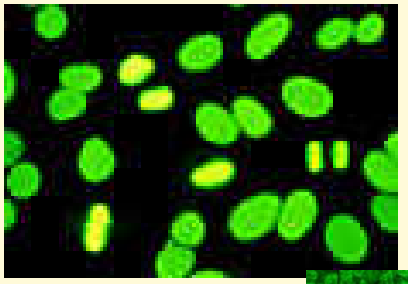
Basismethode der Autoimmunanalytik:

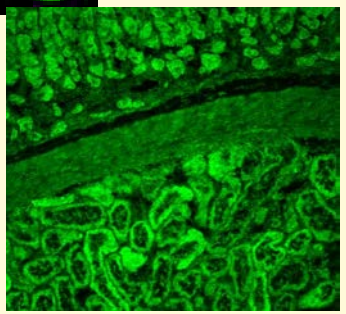
liefert die umfassendsten Informationen für die weiterführende Diagnostik, v.a.

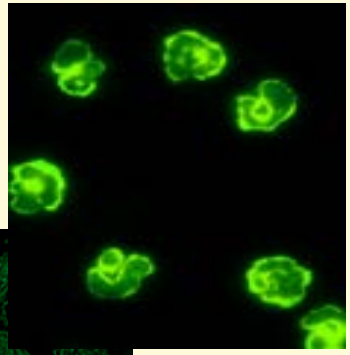
- bei unklarer Klinik
- zur Verlaufskontrolle

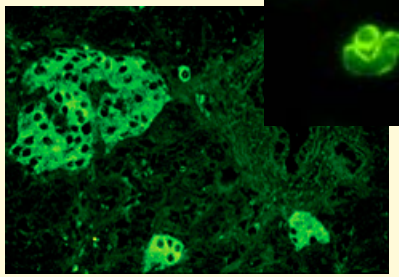


Verwendung verschiedener Substrate zum Nachweis verschiedener AAk









1. **HEp2-Zellen (= humane Epitheliomzellen)**

– Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA)

– Diagnostik von Kollagenosen

– erkennbar aber z. B. auch AMA, ASMA

2. **Gewebeschnitte von Leber, Niere, Magen („Gewebe-Ak“)**

– Nachweis von AMA, ASMA, LKM-Ak, APCA

– Diagnostik von z.B. chronisch-entzündlichen Lebererkrankungen

– erkennbar aber auch ANA

3. **Fixierte Granulozyten**

– Nachweis von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA)

– Diagnostik von Vaskulitiden

– erkennbar aber auch ANA

4. **Organ-/Gewebeschnitte zur Diagnostik organ- und gewebespezifischer AAk**

Quelle: Euroimmun-AG

Vorteile der IFT:

- hohe Spezifität: großer Signalunterschied bei positiven und negativen Proben
- hohe Sensitivität: Erfassung vieler Antikörper
- gleichzeitige Erfassung von Antikörpern gegen mehrere, unterschiedliche autoantigene Zielstrukturen eines Substrats in ein und demselben Analyseansatz
- kosteneffektiv

Aber:

- Auswertung nur durch spezialisiertes Personal mit viel Erfahrung möglich

Besonderheiten der Autoimmundiagnostik

1. falsch positive und negative Befunde können nie sicher ausgeschlossen werden, wenn nur eine Methode (z.B. Blot) eingesetzt wird
2. unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten der verschiedenen Nachweismethoden (unterschiedliche Ergebnisse zwischen Labors möglich!)
3. Standardisierbarkeit ist eingeschränkt durch die Nicht-Automatisierbarkeit
4. Interpretation der AAk-Befunde muss unter Berücksichtigung der Klinik erfolgen
5. Viel Erfahrung im Labor nötig !

Quelle: Conrad, Schößler, Hiepe

Unspezifische Reaktion oder präsymptomatisch nachweisbar ?

CRP i.S. (Turb.)	4.2	mg/l		< 5.0
Rheumafaktor Klasse IgM i.S.	**74.4**	IU/ml		< 20.0
Rheumafaktor Klasse IgA i.S.	**30.5**	U/ml		< 20.0
CCP-AAk (Cycl.Citrull.Peptid) i.S.	**11.32**	Ratio		< 1.00

Interpretation:
Es wurden Rheumafaktoren (RF) der Klasse IgM, IgA und CCP-AAk nachgewiesen. IgM-RF gelten als Klassifikationskriterien einer rheumatoiden Arthritis (RA). Der gleichzeitige Nachweis von IgM-RF, IgA-RF und CCP-AAk gilt als nahezu RA-spezifisch. IgA-RF sind mit einer beschleunigten radiologischen Progression sowie extraartikulären Manifestationen insbesondere Vaskulitiden assoziiert.
CCP-AAK gelten als frühe diagnostische Marker der RA (Spezifität ca. 96 %) und gleichzeitig als prognostischer Marker bezüglich der Entwicklung einer erosiven RA.

ANA (anti-nukleäre Ak) i.S. (IFT)	< 1:100			< 1:100
SS-A (Ro)-AAk i.S. (ELISA)	negativ		negativ	

Interpretation ANA
Kein Hinweis auf ANA. Geringgradig AAk gegen dsDNA nachweisbar. Sie können auf einen möglichen SLE hinweisen, jedoch sind hier ANA und der Bestätigungstest (Crithidien-IFT) negativ. In geringer Frequenz (1-12%) und meist niedrigtitrig sind dsDNA-AAk im ELISA auch bei RA, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, Myasthenia gravis, autoimmunen Hepatiden, Uveitiden, Arzneimittel-induzierten LE-ähnlichen Syndromen und bei verschiedenen Infektionskrankheiten (hier nur transient) nachweisbar.
Bei negativem ANA sollte ein positiver dsDNA-Befund Anlass zu Kontrolluntersuchungen geben (halbjährlich).

dsDNA-AAk (Doppelstrang-DNA) i.S.	**166**	IE/ml		< 100
nDNA-Ak (Crithidie) i.S. (IFT)	< 1:10			< 1:10

Befundinterpretation:
dsDNA-Antikörper positiv: sind spezifisch für einen SLE! Hier aber nicht!