

Autoimmundiagnostik

Was bringt die Zukunft

Günter Steiner

*Universitätsklinik für Innere Medizin III
Medizinische Universität Wien*

*Ludwig Boltzmann Cluster
Rheumatologie, Balneologie und Rehabilitation*



Fragestellungen und Herausforderungen

- **Standardisierung von Autoantikörpern**
Internationale Standards nur für RF und anti-DNA definiert,
provisorische Standards für anti-Cardiolipin
- **Die „seronegativen“ PatientInnen**
Prävalenz diagnostisch wertvoller Autoantikörper <<100%
Viele PatientInnen sind in den etablierten Testsystemen negativ
- **Prognostik**
AutoAk als prognostische Marker, Vorhersagen über
Krankheitsverlauf und Therapie-Erfolg
- **Früh- und Prä-Diagnostik**
Identifizierung gesunder Risikopersonen
Behandlung bei (oder sogar vor?) Krankheitsausbruch

Comparison of Immunoenzymatic Methods for the Detection of ACPA

Bizzaro et al, Clin Chem 2007

100 RA Patients, 128 disease and 74 healthy controls

Manufacturer	Antigen	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Sensitivity at 98% spec
PhaDia	CCP2	98.5	73	74
Euroimmun	CCP2	98.5	72	73
Axis-Shield	CCP2	97	70	70
Eurodiagnostica	CCP2	97	75	73
Inova	CCP2	97	65	64
Inova	CCP3	96	73	67

Problem

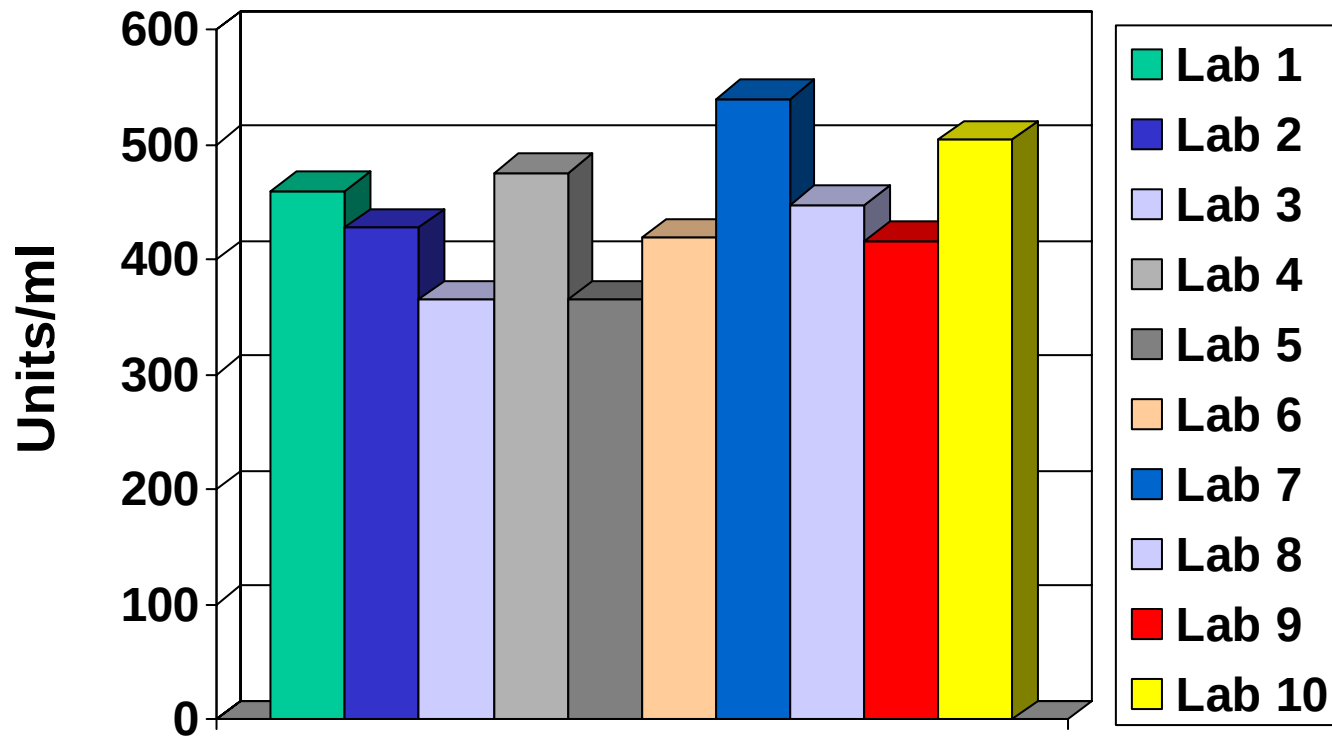
Kein internationaler Standard für ACPA
Hersteller benutzen unterschiedliche Einheiten und Cut-offs

Standardisierung von ACPA (Anti-Citrullinated Protein Antibodies)

- **The IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases**
has authorized Euro-Diagnostica to organize an inter-lab study on a new anti-CCP international standard.
- **Participating countries (10 labs)**
Austria, Brazil, Canada, Denmark, Germany, Italy (2), Israel, Mexico, UK
- **Standard serum (2 vials) and anti-CCP kits**
distributed to all labs
- **Serum to be measured**
A: Vial 1 in two-fold serial dilutions (1:50 – 1:800) – assay linearity
B: Both vials 16-times at 1:50 dilution – intra-assay variance

ACPA Standardisierung

Intra- and Inter-Assay Varianz des anti-CCP ELISAs



Overall results of both vials (mean $\pm$ SD):
419 $\pm$ 53 U/ml

Autoantikörper

Hohe Spezifität-geringe Sensitivität

Antigen	Diagnose	Prävalenz
dsDNA	SLE	40-60%
Sm	SLE	10-15%
ribosomales RNP	SLE	5-7%
Ro (60 kD)	SLE	50-60%
Topoisomerase I	Sklerodermie	25-40%
RNA Polymerase III	Sklerodermie	8-15%
Zentromer (CENP-B)	Sklerodermie (lim.)	70-90%
His tRNA Synthetase (Jo1)	PM/DM	25-30%
Proteinase 3	M. Wegener	80-90%
ACPA (anti-CCP)	RA (Frühphase)	45-55%
Rheumafaktor	RA (Frühphase)	50-60%

Myositis-spezifische AK

- tRNA Synthetasen
(Jo1, PL7, PL12)
- Mi-2
- SRP

Myositis-assoziierte AK

- Ku
- PM/Scl
- Ro RNPs
- U1 snRNP

Autoantikörper bei Myositis

Diagnostische und prognostische Marker

Ghirardello A, Doria A. Autoimmunity 2006

	Gesamt n=99	PM n=39	DM n=40
Anti-Jo-1	27	41	10
Anti-ARS non Jo-1	8	5	5
Anti-Mi-2	14	3	36
Anti-SRP	5	10	2
Anti-Ku	3	-	-
Anti-PM/Scl	3	-	-
Anti-U1RNP	4	3	2
Anti-Ro/SSA	23	23	17

54%

75%

Nachweis von Polymyositis Antikörpern mittels Dot/Line Blots

AlphaDia, D-tek, Euroimmun, Orgentec

- **Antigene**

tRNA Synthetasen: Jo-1, PL-7, PL-12

Mi-2

SRP

PM/ScI

Ku

- **Probleme**

Qualitativer Test (Cut-off nicht genau definierbar)

Keine Referenzseren

Ergebnis stimmt nicht immer mit IIF überein

Bestätigende Tests (Immunoblot, ELISA) selten möglich

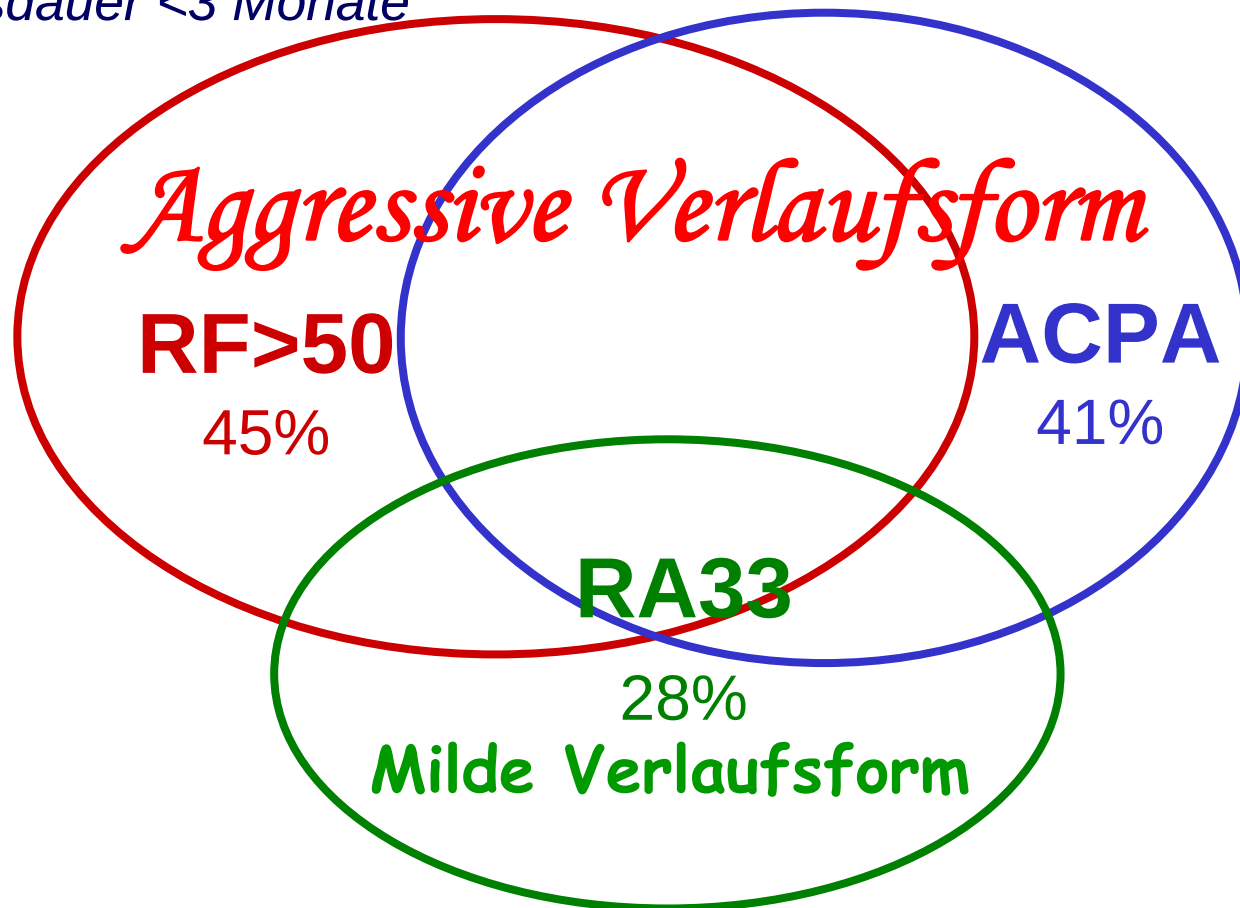
- **Lösung (vorläufig)**

Testsysteme von zwei Herstellern verwenden

Autoantikörper zur Frühdiagnostik der Rheumatoiden Arthritis

Nell et al, Ann Rheum Dis 2005

Krankheitsdauer <3 Monate



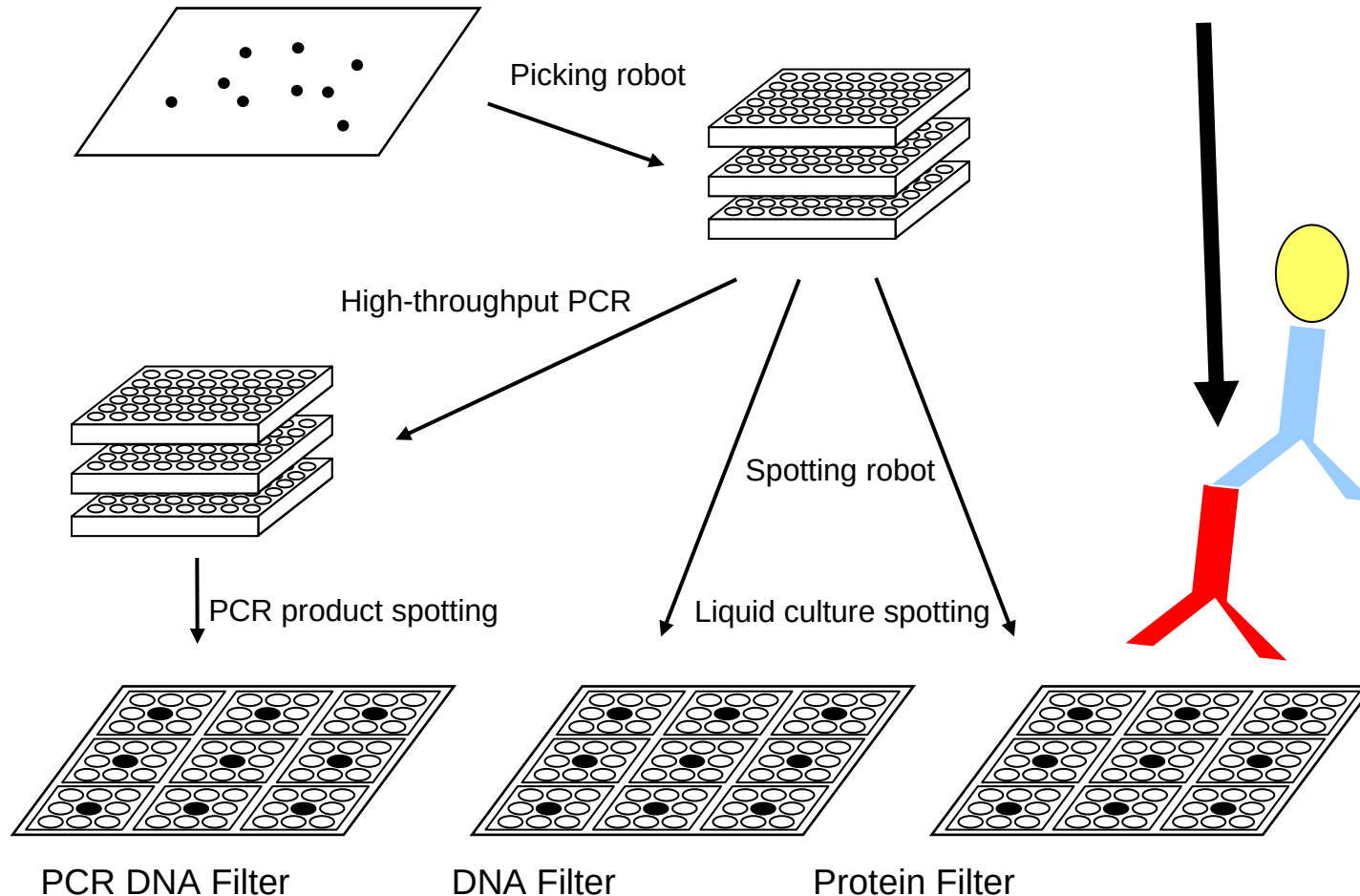
RF und/oder ACPA: 58%

RF und/oder ACPA und/oder anti-RA33: 70%

Identifizierung neuer Autoantigene mittels Protein Macro-Arrays

Karl Skriner, Charité, Berlin

Filter mit ca 36.000 humanen Proteinen
Sera von RA PatientInnen und Gesunden



187 verschiedene Proteine von gepoolten RA Seren erkannt

- Nukleinsäure bindende Proteine 48 %
- Enzyme 9 %
- Signaltransduktionsproteine 5 %
- Andere mit bekannter Funktion 23 %
- Andere mit unbekannter Funktion 15 %

**Welche sind wirklich relevant?
Spezifität und Sensitivität?**

Identifizierung neuer Autoantigene durch proteomische Methoden

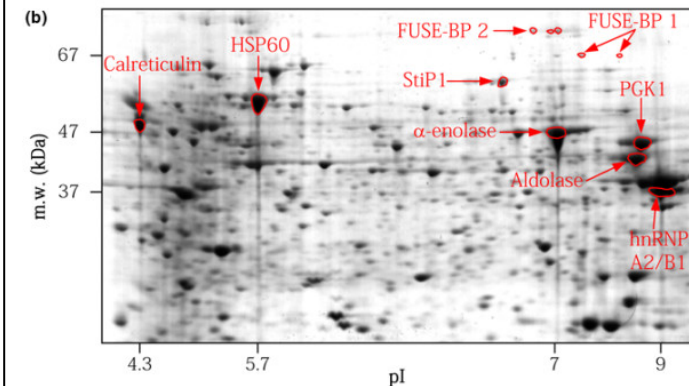
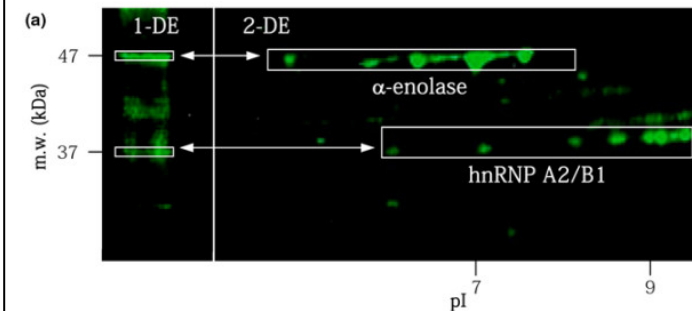
Goeb et al, Arthritis Res Ther 2009

110 PatientInnen mit Früh-RA und 70 Kontrollen
Zweidimensionale Immunoblots (Gesamtzellextrakte)

Candidate Antigen

RA sera (%)

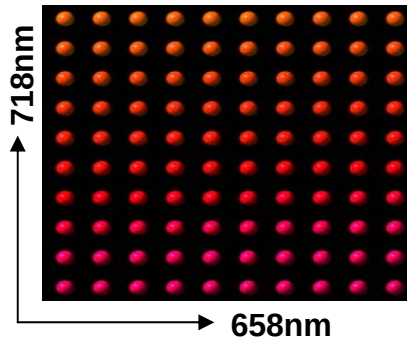
- | | |
|--------------------------------|----|
| • HnRNP A2/B1 (RA33) | 28 |
| • Aldolase | 34 |
| • Phosphoglycerate kinase 1 | 4 |
| • Alpha-Enolase | 48 |
| • Calreticulin | 8 |
| • Heat shock protein 60 | 23 |
| • Stress-induced phosphoprot 1 | 10 |
| • FUSE-BP1 | 13 |
| • FUSE-BP2 | 36 |
| • BiP | 8 |



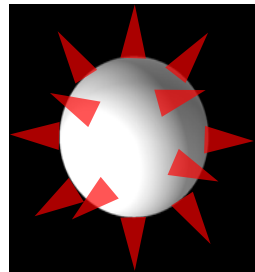
Gleichzeitige Detektion vieler Antikörper

Luminex Bead Technology

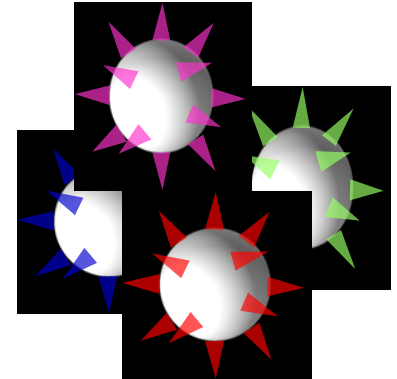
microspheres (5.6 μm)



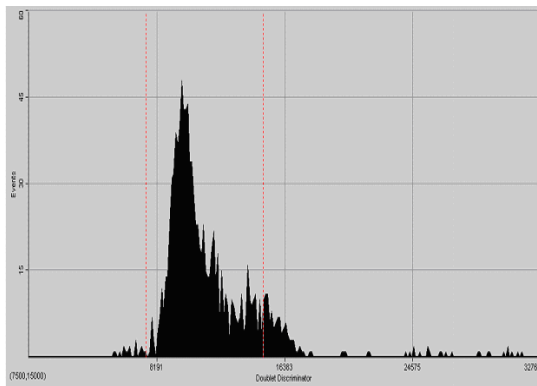
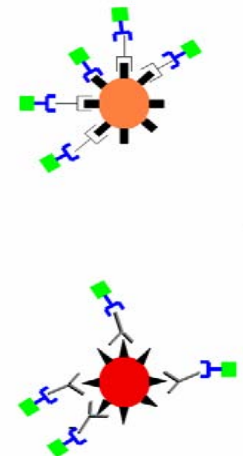
covalent coupling
of antigens



mixing of
microspheres



serum
+
anti-Ig-PE



“bead specific” histogram

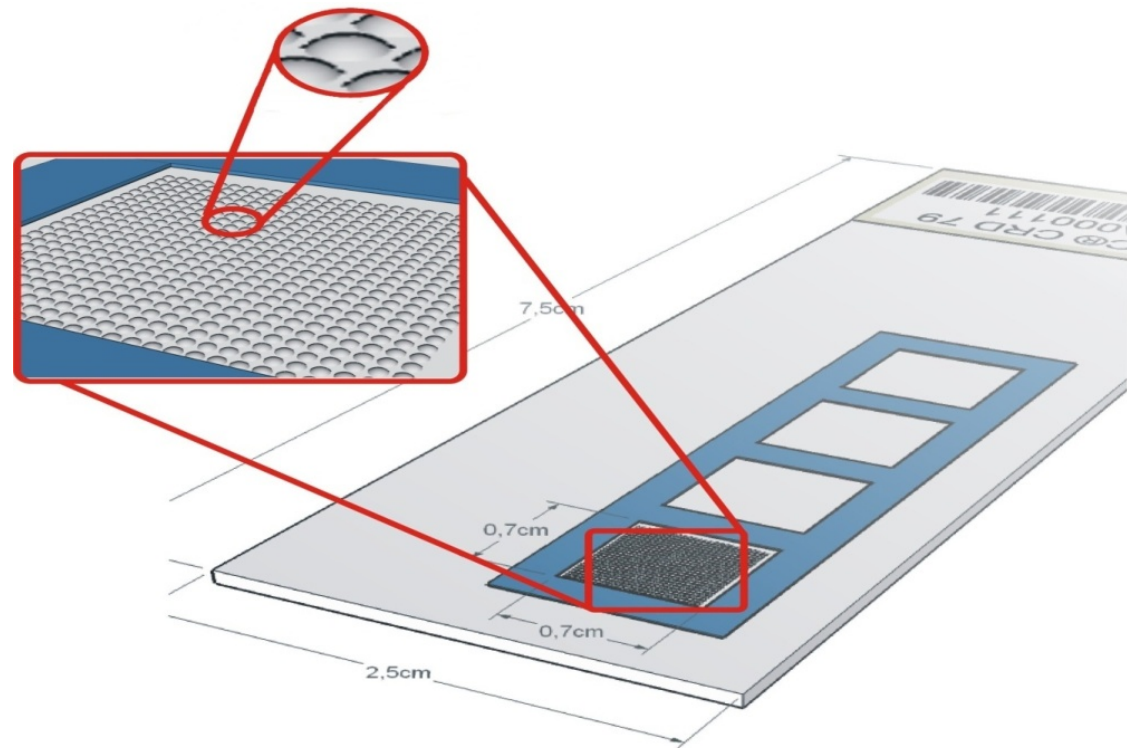


flow cytometer

Gleichzeitige Detektion vieler Antikörper Autoantikörper Microarray ("RheumaChip")

Johan Rönnelid, Universität Uppsala
in Zusammenarbeit mit PhaDia im Rahmen des
EU-geförderten Rheumaforschungs-Netzwerks AutoCure

Standard glass slide
Several arrays per chip
Hundreds of features
(antigens) per array
Microscopic dimensions
< 300 picogram antigen
per spot
2 μ l serum / test



Der RheumaChip

„Arbeitsanleitung“

Prepare serum

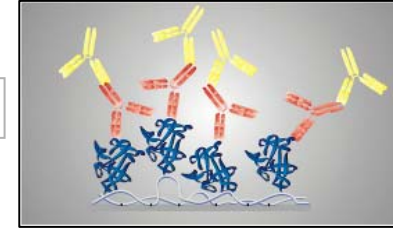


Incubate sample



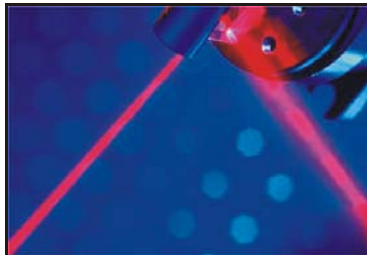
Wash

Stain with SAb



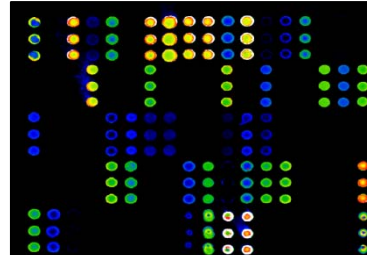
Duration: 3 hours

Scan biochip



Wash

Analyse images



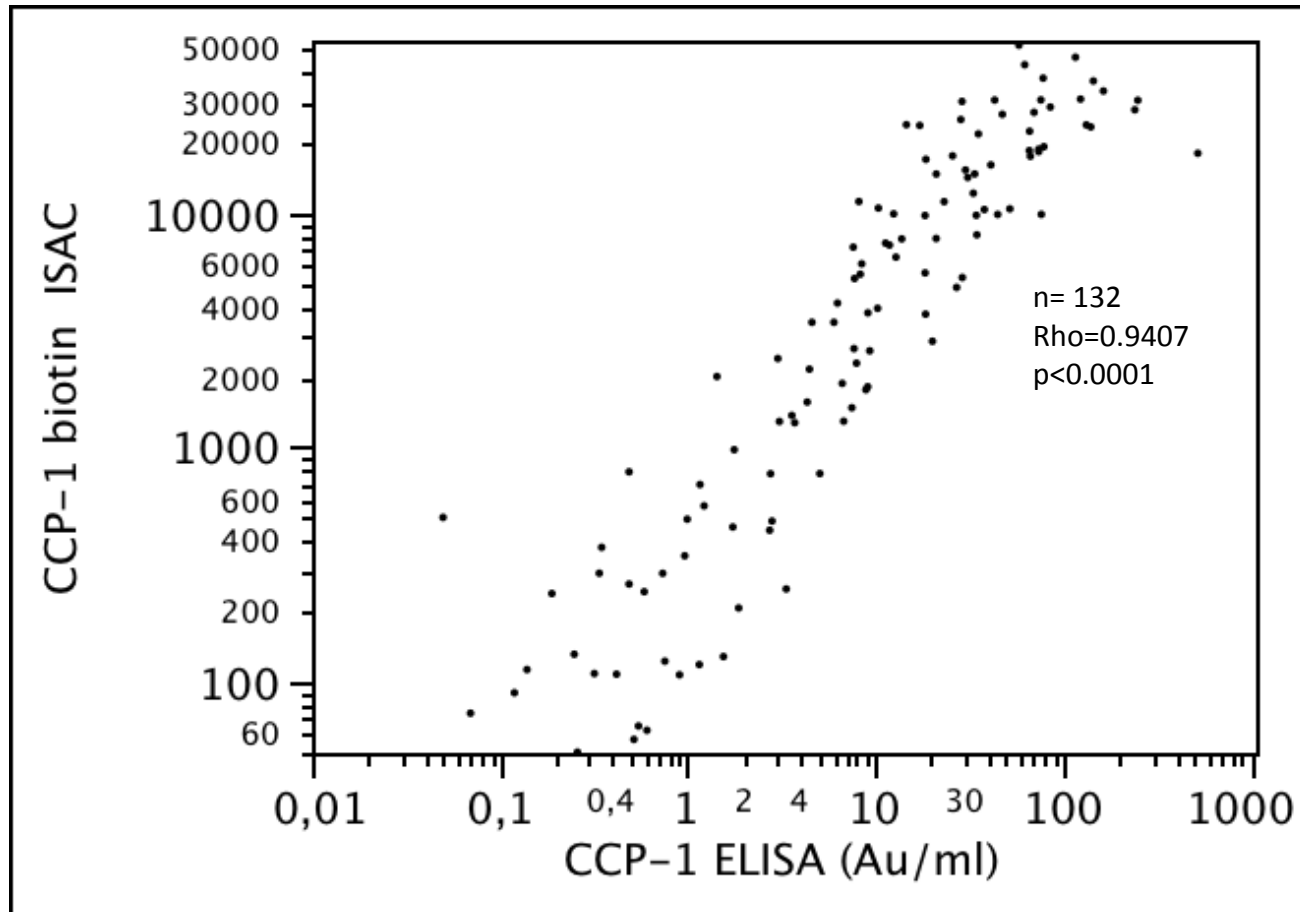
Create report

Apis mellifera	Apim m 1	0	0.00	Negative
Apis mellifera	Apim m 1	0	0.00	Negative
Aspergillus fumigatus	rAsp f 1	0	0.00	Negative
Aspergillus fumigatus	rAsp f 1	52527	42.99	Intermediate
Betula verrucosa	rBet v 1a	54528	43.98	Intermediate
Betula verrucosa	rBet v 2	16490	10.61	Intermediate
Betula verrucosa	rBet v 1d	0	0.00	Negative
Canis familiaris	Can F 3 (Dog all...)	20224	27.29	Intermediate
Canis familiaris	Can F 1	14866	17.27	Intermediate
Daucus carota	rDau r 1	0	0.00	Negative
Gallus gallus	Chicken Serum ...	0	0.00	Negative
Cupressus arborescens	rCup a 1	26773	26.37	Intermediate
Phleum pratense	rPhl p 2	67439	51.25	High
Phleum pratense	rPhl p 1	4904	7.77	Intermediate
Phleum pratense	rPhl p 12	2022	5.22	Intermediate
Phleum pratense	rPhl p 7	94407	60.27	High
Phleum pratense	rPhl p 5	75034	55.34	High
Phleum pratense	rPhl p 6	62562	59.26	High
Cynodon dactylon	rCyn d 12	13599	14.44	Intermediate
Triticum sp.	Tri a 18 (wheat ...)	0	0.00	Negative
Triticum sp.	Tri a 19 (wheat ...)	0	0.00	Negative
Penaeus indicus	rPen i 1	0	0.00	Negative
Penaeus monodon	rPen m 1	0	0.00	Negative
Salix alba	Sal a 1	56099	45.12	Intermediate

Duration: 10 min

RheumaChip

Validierung von Anti-CCP



Validiert

- CCP-1
- Enolase CEP-1
- Fibrinogen 36
- Fibrinogen 573
- Fibrinogen 591
- Vimentin 60
- Vimentin 2

In progress:

- RA33
- Collagen type II
- CII-Peptides
including
citrullinated
analogues
- Enolase CEP-11

Autoimmun-Diagnostik Heute & Morgen



- Identifizierung neuer Autoantigene
- Entwicklung von Multiparameter-Assays
- Definierung von Autoantikörpermustern („pattern“) mit diagnostischem bzw. prognostischem Wert
 - Prä-Diagnostik