

Die AI-Line: Die flexible und zuverlässige Produktlinie zur Autoantikörper Diagnostik

Hintergrund

Autoantikörper (AAK) stellen einen wichtigen Beitrag zur Diagnose von systemischen Autoimmunerkrankungen dar. Die AI-Line ist eine ELISA Produktlinie zur semi-quantitativen Detektion von AAK in humanem Serum oder Plasma. Die Antigene für die ELISAs der AI-Line wurden sorgfältig ausgewählt und umfassen hoch reine native Antigene, rekombinante Proteine und synthetische Peptide. Die Entwicklung der AI-Line wurde in enger Zusammenarbeit mit weltweit führenden Experten und Laboratorien mit Schwerpunkt AAK-Diagnostik durchgeführt. Durch diese enge Kooperation konnten die einzelnen Tests individuell optimiert werden, was sich in den hervorragenden diagnostischen Leistungsmerkmalen der Tests widerspiegelt. Die ELISAs der AI-Line wurden vielfach in internationalen klinischen Studien zur Detektion von AAK eingesetzt, was die Akzeptanz und Zuverlässigkeit des Testsystems untermauert. Neben den hervorragenden Leistungsmerkmalen weisen alle ELISAs eine große Benutzerfreundlichkeit auf. Alle ELISAs verwenden einen einheitlichen Wasch- und Probenpuffer sowie eine einheitliche Testprozedur, wodurch eine flexible und Patienten-spezifische Abarbeitung, sowohl manuell als auch voll automatisiert, ermöglicht wird (siehe Abbildung 1). Alle Tests basieren auf einer Ein-Punkt Kalibrierung und beinhalten jeweils eine Positiv- und negativ Kontrolle.

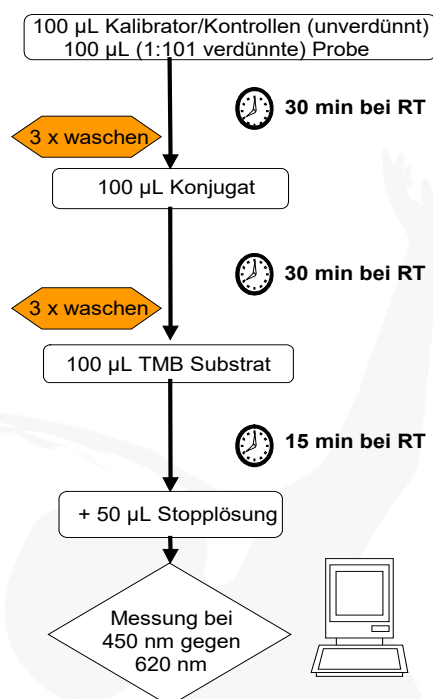


Abbildung 1 Test-Schema AI-Line ELISAs.

ANA Screen (REF: 25012)

Der ANA Screen ELISA ist als Eingangsscreening Test („first line screening“) konzipiert und erfasst die aus klinischer Sicht wichtigsten AAK gegen die Autoantigene Doppelstrang DNA (dsDNA), Ro (SS-A), La (SS-B), Smith Antigen (Sm), Ribonukleoproteine (RNP), Topoisomerase I (Topo I, Scl-70), Zentromer (CENP), t-RNA_{His} Synthetase (Jo-1) und PM1-Alpha. Jeder AAK weist eine unterschiedliche klinische Sensitivität, Spezifität und Bedeutung auf (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Antigene und Krankheitsassoziation der AI-ELISAs

Antigen	Krankheitsassoziation
dsDNA ^(r)	Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)
Ro52 ^(r)	SLE, SjS, SSc
Ro60 ^(r)	Sjögren Syndrom (SjS)
La ^(r)	Sjögren Syndrom (SjS)
RNP/Sm ⁽ⁿ⁾	Mischkollagenose
Sm ⁽ⁿ⁾	SLE
Jo-1 ^(r)	Polymyositis (PM)
Scl-70 ^(r)	Systemische Sklerose (SSc)
CENP ^(r)	Systemische Sklerose (SSc)
PM1-Alpha ^(s)	PM/SSc Überlappungssyndrom
Rib-P ^(s)	SLE



Als Vorteile des ANA Screen ELISAs gegenüber der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) sind die einfache Abarbeitung und Interpretation der Ergebnisse hervorzuheben. Es ist unumstritten, dass der ANA Screen ELISA in der Antigenvielfalt nicht mit der HEp-2 Zelle konkurrieren kann. Dennoch sind die aus klinischer Sicht relevantesten Antigene im ANA Screen ELISA enthalten. AAK gegen andere Antigene sind selten und kommen häufig zusammen mit AAK gegen die Hauptantigene vor. Daher werden Proben mit seltenen AAK, auch wenn deren korrespondierenden Antigene nicht im ANA Screen enthalten sind, als positiv erkannt. Viele AAK besitzen ferner keine klinische Relevanz, oder diese ist derzeit noch unbekannt. So enthalten viele Seren AAK gegen DFS70 (*dense fine speckled* Antigen 70 kDa), die nicht mit systemischen Autoimmunerkrankungen assoziiert sind [1]. Des Weiteren lassen sich einige AAK mit hoher klinischer Relevanz (z.B. anti-Jo-1, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Rib-P) nur mit geringer Sensitivität in der IIF nachweisen [2]. Der ANA Screen ELISA zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit Bestätigungstests wie z.B. den Einzelparameter ELISAs der AI-Line (Dr. Fooke Laboratorien) oder dem *recomLine* ANA/ENA Line-Immuno-Assay (Mikrogen). Dies konnte mit einer Posterpräsentation, vorgestellt auf dem 10. Kongress für Autoantikörper in Guadalajara, Mexiko 2008, bereits belegt werden [3]. Um die Zuverlässigkeit der ANA-Screen ELISA-Tests noch weiter zu verbessern wurde eine neue Beschichtungsstrategie entwickelt, die eine hohe Beschichtungsdichte von dsDNA neben den Protein-Antigenen erlaubt, was sich in einer überragenden Sensitivität des ANA Screen ELISAs für dsDNA Antikörper widerspiegelt.

PM1-Alpha (REF: 25001)

Ein besonderes *Highlight* der AI-Line stellt der PM1-Alpha ELISA dar. Durch den Einsatz eines hoch-reinen, hoch-immunogenen Peptid-Antigens erreicht dieser ELISA eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität als her-

kömmliche Methoden zur Detektion von anti-PM/Scl-AAK [4,5]. In einer jüngsten Studie im Labor von Prof. Humbel (Centre Hospitalier, Luxembourg) und Dr. R. Mierau (Rheumaklinik Aachen) konnte die Überlegenheit des PM1-Alpha Peptids gegenüber den rekombinanten Antigenen PM/Scl-75c und PM/Scl-100 belegt werden [6].

SS-A, Ro52 und SS-B (REF: 25006-8)

Für die Detektion von anti-SS-A (Ro60), Ro52 und SS-B AAK bietet die AI-Line die Einzelparameter ELISA Ro52, Ro60 und La an. Bei dem SS-A (Ro60) ELISA handelt es sich um den ersten am Markt erhältlichen ELISA, der ein neues rekombinantes SS-A (Ro60) Protein verwendet [7]. Die separate Detektion von anti-Ro52 und anti-SS-A (Ro60) AAK ist von großer Bedeutung, da das isolierte Auftreten von anti-Ro52 (ohne anti-SS-A (Ro60)) auf Myositis oder mit geringerer Häufigkeit auf SSc hindeutet [8] und bis zu 20% der Einzelreaktivitäten gegen SS-A (Ro60) oder Ro52 verdeckt werden können, wenn ein Testsystem mit einer Mischung der beiden Antigene verwendet wird [8,9].

Ribosomal P (REF: 25002)

Die Detektion von anti-Rib-P AAK ist aufgrund der hohen Krankheitsspezifität für SLE von hoher klinischer Bedeutung [10]. Die Sensitivität der IIF für die Detektion von anti-Rib-P Antikörpern ist sehr gering. Weit mehr als 50% der anti-Rib-P positiven Proben erzeugen in der IIF kein für anti-Rib-P Antikörper typisches, zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster. Daher sollte bei Verdacht auf SLE eine ELISA-Testung auf anti-Rib-P Antikörper durchgeführt werden. Die Auswahl des Antigens für den Rib-P Assay ist ebenfalls von großer Bedeutung, da Antikörper gegen das Ribosomal P2 Protein in Patienten mit Hepatitis C Virus (HCV) Infektion ohne Verdacht auf SLE detektiert werden können. Aus diesem Grund basiert der Rib-P ELISA auf einem hoch-reinen, synthetischen Antigen, welches ausschließlich das SLE-spezifische Epitop enthält.



dsDNA (REF: 25005)

Zur Detektion von anti-dsDNA Antikörpern steht eine Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Verfügung. Neben der Immunfluoreszenz auf Chrithidien Substrat (CLIFT) werden häufig dsDNA ELISAs eingesetzt. Der CLIFT weist zwar eine hohe Spezifität auf, besitzt jedoch eine sehr geringe Sensitivität [11]. Der dsDNA ELISA der AI-Line basiert auf einer hoch-aufgereinigten, rekombinant hergestellten Plasmid-DNA. Der Test kombiniert hohe Sensitivität und Spezifität für den SLE und ermöglicht somit eine sichere SLE-Diagnostik [12].

RNP/Sm (REF: 25010; 25011)

Für die Detektion von RNP/Sm Antikörpern bietet die AI-Line zwei ELISA Tests. Der RNP/Sm ELISA verwendet ein immunchromatographisch aufgereinigtes Antigen, welches alle RNP/Sm Antigene als Komplex enthält. Auf diesem Weg ist eine hoch sensitive Detektion von anti-RNP/Sm Antikörpern möglich. Der Sm ELISA basiert auf hoch-reinem SmD Antigen. Während Anti-RNP/Sm AAK in verschiedenen Kollagenosen nachgewiesen werden können, sind Antikörper gegen das SmD Autoantigen hoch spezifisch für den SLE [12]. Sowohl der RNP/Sm als auch der Sm ELISA zeigt eine gute Übereinstimmung mit Referenzmethoden zur Detektion von anti-RNP/Sm Antikörpern. Da SmD Proteine die modifizierten Aminosäure Dimethylarginin (DMA) enthalten, welche nicht rekombinant erzeugt werden kann, sollten native Proteine oder synthetische Peptide für den Nachweis von anti-Sm Antikörpern bevorzugt werden.

Scl-70 und CENP B (REF: 25003; 25004)

Für die Detektion von Sklerodermie-assoziierten Antikörpern bietet die AI-Line zwei ELISA Tests basierend auf rekombinanten Proteinen aus Insektenzellen. Anti-Scl-70 Antikörper wurden lange Jahre als hoch-spezifisch für die systemische Sklerose beschrieben. In den letzten Jahren wurden anti-Scl-70 Anti-

körper in Seren von Patienten mit SLE beschrieben und CENP-Antikörper in Seren von Patienten mit Primär biliärer Cirrhose (PBC). In einer jüngsten Studie mit dem Scl-70 ELISA der AI-Line konnte die aus der Literatur bekannte, hohe Krankheitsspezifität für SSc bestätigt werden [13].

Jo-1 (REF: 25009)

Das Antigen Jo-1 (Aminoacyl-tRNA Synthetase) wurde zuerst in dem Serum eines Myositis Patienten gefunden. Eine große Anzahl von Patienten mit dem Synthetase Syndrom leiden an interstitieller Lungenbeteiligung, dem Raynaud Phänomen, den sog. Mechanikerhänden und Arthritis. Anti-Jo-1 Antikörper sind stark assoziiert mit singular auftretenden anti-Ro52-AAKs [9]. Mehr als 70% aller anti-Jo-1 positiven Seren bei Myositis zeigen ebenfalls eine anti-Ro52 Reaktivität. Neben Jo-1 können auch andere Synthetasen (. PL-7, PL-12, OJ) das Ziel von Autoantikörpern sein, allerdings mit geringerer Frequenz.

Krankheitsspezifische Profile (REF: 25019, 25021; 25023)

Zur Symptom-orientierten Diagnostik umfasst die AI-Line krankheitsspezifische Profil-ELISAs mit den aus klinischer Sicht wichtigsten Antigenen auf farblich codierten Kavitäten. Verfügbar sind:

-SLE Profil 4 (Ref: 25019) mit den Antigenen dsDNA, Sm, RNP-Sm und Rib-P

-SLE Profil 6 (Ref: 25021) mit den Antigenen dsDNA, Sm, RNP-Sm, Rib-P, Ro52 und La-SSB

-ENA Profil 8 (Ref: 25023) mit den Antigenen dsDNA, RNP-Sm, Sm, Ro52, La-SSB, Scl 70, CENP und Jo-1.

CENP-A (REF: 25024)

Der CEPNP-A ELISA ist der erste Assay zur Detektion von Anti-Zentromer-Antikörpern (ACA) der ein neues aus dem Zentromer-A Protein abgeleitetes Peptid nutzt (Patentanmeldung). Dieser Assay zeigt eine signifikant höhere Spezifität gemessen an



anderen Tests. Anti-Zentromer Antikörper treten in 20-50% bei Patienten mit SSc auf (die Häufigkeit ist dabei vom Detektionssystem und der Patientenkohorte abhängig), können aber auch bei anderen Erkrankungsformen wie SLE, Rheumatoider Arthritis (RA) und PBC gefunden werden. Epitop-Untersuchungen zeigten, dass CENP-A und CENP-B die häufigsten Zentromer Autoantigene sind. Viele Studien zeigen eine Assoziation zwischen ACA und CREST (Calcinosis, Raynaud phänomen, Oesophagealer Dysmotilität, Sclerodactylie, und Teleangiektasien).

Literatur:

1. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y *et al.*: **Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 892-900.
2. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, de Keyser F: **Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests.** *Clin Chem* 2002, **48**: 2171-2176.
3. Mahler M, Eisfeller P, Silvermann ED, Fritzler MJ: **Diagnostic value of a novel ANA Screen ELISA.** *10th International Workshop on autoantibodies and autoimmunity, Guadalajara* 2008.
4. Mahler M, Raijmakers R, Dahnrich C, Bluthner M, Fritzler MJ: **Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**: R704-R713.
5. Mahler M, Raijmakers R: **Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights.** *Autoimmun Rev* 2007, **6**: 432-437.
6. Mahler M, Fritzler MJ: **PM1-Alpha ELISA: the assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies?** *Autoimmun Rev* 2009, **8**: 373-378.
7. Schulte-Pelkum J, Fritzler MJ, Szmyrka-Kaczmarek M, Petschinka M, Simon T, Mahler M: **Evaluation of recombinant Ro60 for diagnostic use in AI-Line ELISA.** *6th International Congress on Autoimmunity, Porto* 2008, (Poster Presentation).
8. **Ro/SS-A Antibodies.** In *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases*. Edited by Conrad K, Schoessler W, Hiepe F, Fritzler MJ. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2008:167-172.
9. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M: **Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system.** *Autoimmun Rev* 2009, **8**: 632-637.
10. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y *et al.*: **International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins.** *Clin Vaccine Immunol* 2006, **13**: 77-83.
11. Mahler M, Fritzler MJ: **Anti-dsDNA antibody testing in the clinic: Farr or ELISA?** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007, **3**: 72-73.
12. Mahler M, Fritzler MJ, Bluthner M: **Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylation of an arginine residue as a specific target of a subpopulation of anti-Sm antibodies.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**: R19-R29.
13. Mahler M, Petschinka M, Luettich T, Hiepe F, Szmyrka-Kaczmarek M, Fritzler M: **Anti-Topo-I/Scl-70 Autoantibodies in systemic Lupus Erythematosus: myth or reality?** *6th International Congress on Autoimmunity, Porto* 2008, Poster Presentation.

