

Klinische Wertigkeit der Identifizierung von zirkulierenden Autoantikörpern gegen Sm, RNP, SSA und SSB durch Doppel-Immundiffusion bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen

G. Haberhauer, D. Isoviets, H. Bröll

2. Med. Abt. mit Rheumatologie, Osteologie und rheumaserologischem Labor
Kaiser-Franz-Josef-Spital, Wien

Zusammenfassung:

Die Identifizierung von ANA-Spezifitäten ist eine wertvolle Hilfe für Diagnose und Prognose rheumatischer Erkrankungen. Wir haben AK gegen Sm, RNP, SSA (Ro) und SSB (La, Ha) in 109 Seren von Patienten mit verschiedenen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen mit der Doppel-Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony nachgewiesen. Unsere Ergebnisse zeigten eine hohe klinische Relevanz und stimmten weitgehend mit den in der Literatur vorherrschenden Daten überein. Die Doppel-Immundiffusionstechnik kann von uns als hoch spezifisch, bei einfacher Durchführbarkeit, bei der Identifizierung von AK gegen Sm, RNP, SSA und SSB klassifiziert werden.

Schlüsselwörter:

Antinukleäre Antikörper – Antikörper gegen Sm/RNP/SSA/SSB – Ouchterlony-Technik

Summary:

The identification of the specific ANA helps in the diagnosis, management and treatment of patients with rheumatic diseases. We detected antibodies to Sm, RNP, SSA (Ro) and SSB (La, Ha) in 109 sera from patients with several inflammatory rheumatic disorders using a standardized method of a gel double diffusion precipitation test (Ouchterlony technique). Our results show a high clinical relevance and were comparable with the preponderate data in literature. We may conclude, that the gel double diffusion assay has excellent specificity and ease of performance for detecting antibodies to Sm, RNP, SSA and SSB.

Keywords:

Antinuclear antibodies – Antibodies to Sm/RNP/SSA/SSB – Ouchterlony technique

1. Einleitung

Zirkulierende Autoantikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) wie Sm (= Smith), RNP (= Ribonucleoprotein; nRNP, U1-RNP), SSA (= Sjögren-Syndrom A; Ro) und SSB (= Sjögren-Syndrom B; La, Ha) gelten als wertvolle, zusätzliche diagnostische und prognostische Parameter für Autoimmunerkrankungen wie systemischen Lupus erythematosus (SLE), Sharp-Syndrom (mixed connective tissue disease, MCTD), Morbus Raynaud, chronische Polyarthrit (CP) und Sjögren-Syndrom (SS) (20).

Als Nachweismethoden stehen derzeit Immunoblotting, Counter-Elektrophorese, Radioimmunassay, Festphasen-ELISA, passive Hämagglutination und Immundiffusion zur Verfügung (3).

Das unkomplizierteste Verfahren stellt die Doppel-Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony dar (14). Wir haben anhand eines größeren Patientenkollektives ihre klinische Wertigkeit geprüft.

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

109 Seren von Patienten einer medizinischen Abteilung mit Schwerpunkt Rheumatologie, bei denen aufgrund anamnestischer und aktueller Daten zirkulierende antizelluläre Antikörper vermutet werden konnten, wurden bei -20°C tiefgefroren gesammelt. Im abteilungseigenen rheumaserologischen Labor erfolgte anschließend, ungeachtet der Erkrankung, die Bestimmung von 1. Antinukleären Antikörpern (ANA), 2. Antikörpern gegen dsDNA, 3. Antikörpern gegen Sm, RNP, SSA und SSB.

2.2 Methoden

2.2.1 ANA-Nachweis

Die ANA-Bestimmung erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz auf kommerziellen HEp-2-Zellsubstrat mit FITC-konjugiertem Anti-Human-IgG/F(ab)₂ vom Kaninchen und Evans-blue-Phosphat-Pufferlösung. Die

Serumverdünnung erfolgte mit phosphatgepufferter isotoner Kochsalzlösung. Es wurden jeweils die Titerstufen 1:20, in geometrischer Verdünnung bis 1:1280 ausgetestet. Die letzte Titerstufe, die noch als positiv (wie Positiv-Kontrolle) bewertet werden konnte, wurde als Ergebnis betrachtet (2).

2.2.2 Nachweis von Anti-dsDNA-AK

Der Anti-dsDNA-AK-Nachweis erfolgte ebenfalls immunfluoreszenzmikroskopisch mit Crithidia-luciliae-Substrat, Anti-Human-IgG/F(ab)₂ vom Kaninchen und Evans-blue-Phosphat-Pufferlösung. Die Serumverdünnung erfolgte mit PBS auf 1:20, bei deutlich homogenem Aufleuchten des Kinetoplasten (Mitochondrien), eventuell zusätzlichem Aufleuchten des Zellkernes, wurde die Serumprobe als Anti-dsDNA-AK-haltig bewertet (16).

2.2.3 AK gegen Sm, RNP, SSA und SSB

Die Identifizierung dieser ENA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Sm/RNP and SSA/SSB ENA Test Kit®, Fa. Kallestad Diagnostics), durch das gleichzeitige und nebeneinander Diffundierenlassen von unverdünntem Patientenserum und der jeweiligen Positiv-Kontrolle gegen einen polyvalenten Extrakt aus Kälberthymuszellen, der u.a. die Antigene Sm, RNP, SSA und SSB enthält (10).

Der Test Kit ENA® enthält Agarose-Gel-Platten mit je einem zentralen (Ø 6,5 mm) und sechs peripheren (Ø 5,0 mm) rosettenartig angeordneten Vertiefungen im Abstand von 2,0 mm zueinander. Ferner lyophilisierten Sm/RNP- und SSA/SSB-haltigen Kälberthymusextrakt und vier Positiv-Kontrollen (Human-Seren) für Sm/RNP, RNP, SSA/SSB und SSA. Durch das unterschiedliche Auftragen von Patientenseren und Positiv-Kontrollseren in den peripheren Gelvertiefungen ist sowohl Screening als auch Identifizierung möglich.

Der Immundiffusionsvorgang ist nach 48 Std. abgeschlossen. Das Ablesen erfolgt im Durchlicht.

Ein Serum enthält nur dann ein bestimmtes ENA, wenn seine Präzipitationslinie gegen den Kälberthymusextrakt im Zentrum der Gelplatte an den Berührungspunkten mit der Präzipitationslinie des entsprechenden Positiv-Kontrollserums gegen denselben Kälberthymusextrakt völlige Konkordanz zeigt.

2.2.4 Auswertung

Nach Abschluß der Laborarbeiten erfolgte die Zuordnung der gefundenen antizellulären Antikörper zu den zum Zeitpunkt der Serumgewinnung aktuellen Krankheitsbildern. Bei Erkrankungen aus dem Formenkreis des entzündlichen Rheumatismus wurden die Empfehlungen der „American Rheumatism Association“ (ARA) weitgehendst berücksichtigt (1, 5, 6, 8, 17, 19).

Zur Ortung möglicher, unspezifischer Kreuzreaktionen sind 7 Seren von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und 5 Seren von Patienten mit verschiedenen Paraproteinämien mitgetestet worden. Die Ergebnisse wurden prozentual mit den in der Literatur angegebenen Daten verglichen (4, 7, 9, 11–13, 15, 18).

3. Ergebnisse

Es fanden sich folgende, den Seren zuordenbare Krankheitsbilder: 25mal ein SLE (≥ 4 ARA-Kriterien), 8mal ein SLE (< 4 ARA-Kriterien), 7mal ein D-Penicillamin-induziertes Lupus-Syndrom, 8mal ein Sharp-Syndrom, 2mal eine progressive System-Sklerose (PSS), 4mal ein CREST-Syndrom (Calcinosis cutis, M. Raynaud, ösophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie, Telangiektasien), 4mal ein (solitärer) M. Raynaud, 2mal eine eosinophile Fasziitis (Shulman-Syndrom), 30mal eine (lupoide) CP und 7mal eine CP mit sekundärem SS.

Die tabellarische Zuordnung von ANA-Titer, AK gegen dsDNA, Sm, RNP, SSA, SSB zu den Krankheitsbildern findet sich in Tab. 1. In 5,5% der Seren wurden AK gegen Sm, in 32,1% AK gegen RNP, in 22,0% AK gegen SSA und in 10,1% AK gegen SSB mit dieser Methode eindeutig identifiziert.

In den Seren fanden sich folgende ENA-Verteilungsmuster:

SLE (≥ 4): 4mal AK gegen Sm + RNP + SSA + SSB, 2mal Sm + RNP + SSA, 2mal RNP + SSA, 2mal SSA + SSB, 1mal SSA, 6mal RNP.

SLE (< 4): 2mal RNP + SSA + SSB, 2mal RNP, 1mal SSA.

DPA-induz. LE: 2mal RNP + SSA + SSB, 1mal RNP + SSA, 1mal RNP, 1mal SSA.

Tab. 1: Zuordnung der gefundenen ANA und AK gegen dsDNA, Sm, RNP, SSA und SSB zu den aktuellen Krankheitsbildern

	n	ANA-Titer				AK gegen				
		≤ 40	80/160	320/640	≥ 1280	dsDNA	Sm	RNP	SSA	SSB
SLE (≥ 4 ARA-Kriterien)	25	2	9	5	9	13	6	14	11	6
SLE (< 4 ARA-Kriterien)	8	1	3	3	1	3	—	4	3	2
DPA-induz. Lupus-Syndrom	7	—	3	4	—	1	—	4	4	2
Sharp-Syndrom (MCTD)	8	—	—	1	7	—	—	8	1	—
Prog. System-Sklerose	2	—	—	2	—	—	—	—	—	—
CREST/CRST-Syndrom	4	—	2	1	1	—	—	1	—	—
M. Raynaud	4	2	1	1	—	—	—	2	—	—
Eosinophile Fasziitis	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—
Chronische Polyarthrit	30	12	7	6	5	1	—	2	1	—
C. P. mit Sjögren-Syndrom	7	3	3	1	—	—	—	—	3	1
Primäre biliäre Cirrhose	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Posthepatitische Cirrhose	3	—	2	1	—	—	—	—	1	—
Alkohol. Lebercirrhose	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—
IgG-Paraproteinämie	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—
IgA-Paraproteinämie	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—
IgM-Paraproteinämie	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—

Sharp-Syndrom: 1mal RNP + SSA, 7mal RNP: hohe ANA-Titer (max. 1:10240).

CREST-Syndrom: 1mal RNP.

M. Raynaud: 2mal RNP.

CP: 1mal RNP + SSA, 1mal RNP.

CP mit sekundärem SS: 1mal SSA + SSB, 2mal SSA.

Posthepatitische Lebercirrhose: 1mal SSA.

AK gegen Sm zeigten eine hohe (100%ige) Spezifität zum SLE mit Aktivitätszeichen, die über diejenige der dsDNA-AK deutlich hinausgeht. Die diagnostische Sensitivität für SLE insgesamt lag jedoch nur bei 18,2%. Anti-RNP-AK und AK gegen SSA waren bei mehreren entzündlich-rheumatischen Erkrankungen anzutreffen.

AK gegen SSB zeigten eine gewisse Spezifität (bei niedriger Sensitivität) zum Formenkreis SLE/SS.

Bei PSS, eosinophiler Fasziitis, primärer biliärer Cirrhose, alkoholischer Lebercirrhose und den Paraproteinämien konnten AK gegen dsDNA, Sm, RNP, SSA oder SSB mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Unsere Ergebnisse sind mit den in der Literatur vorherrschenden Daten für die entsprechenden Krankheitsbilder (4, 7, 9, 11–13, 15, 18) gut in Einklang zu bringen. Die Differenzen sind nicht signifikant. Der SLE (und auch das DPA-induz. Lupus-Syndrom), als Prototyp einer generalisierten, nicht organspezifischen Autoimmunerkrankung zeigte ein vielfältiges („buntes“) Autoantikörper-Spektrum.

Beim Sharp-Syndrom fanden sich als Charakteristikum hochtitrig positive AK gegen RNP.

In einigen Seren von Patienten mit CP und M. Raynaud zeigten sich AK gegen RNP und SSA, die vermuten lassen, daß hier eine „Weiterentwicklung“ des Krankheitsbildes in Richtung SLE, MCTD, CREST-Syndrom, SS, bzw. ein maligner Verlauf bevorsteht (7, 8, 11).

Beim sekundären SS fanden sich bei einem Teil der Patienten die typischen AK gegen SSA und SSB.

In 12 Seren von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und Paraproteinämien zeigten sich nur 1mal AK gegen SSA.

Die Identifizierung von zirkulierenden Autoantikörpern gegen Sm, RNP, SSA und SSB durch Doppel-Immundefusion kann somit von uns als Methode mit hoher klinischer Wertigkeit klassifiziert werden.

Schrifttum:

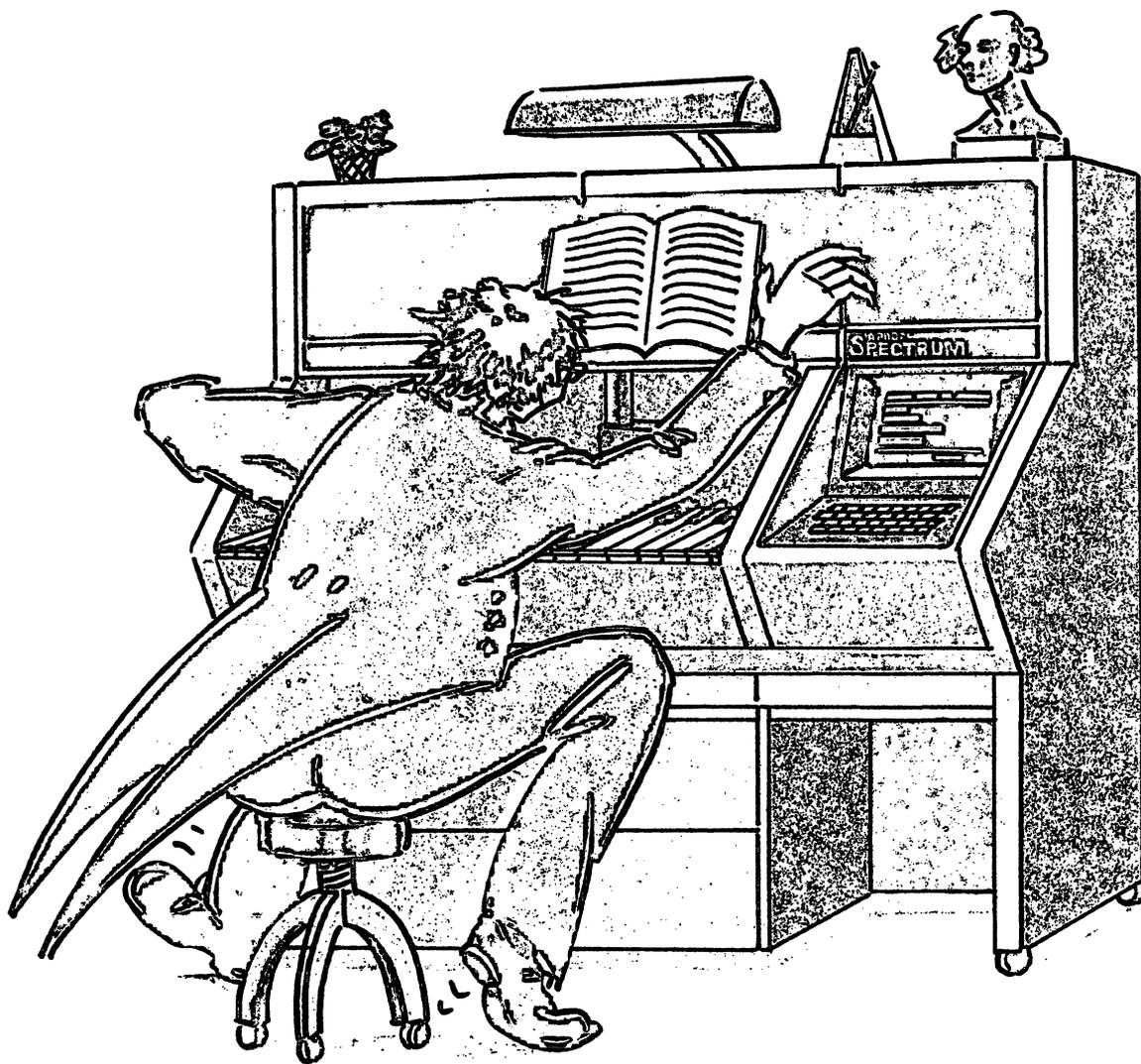
1. ARA subcommittee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthr. Rheumat.* 23, 581–590 (1980).
2. BECK, J. S.: Antinuclear antibodies: Methods of detection and significance. *Mayo Clin. Proc.* 44, 600–608 (1969).
3. BERNSTEIN, R. M.: New approaches to anticellular antibodies. *Curr. Med. Lit. Rheumatol.* 8/1, 3–8 (1987).
4. DUBOIS, E. L.: Serologic abnormalities in spontaneous and druginduced lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2, 204–214 (1975).
5. FOX, R. I., ROBINSON, C. A., CURD, J. G. et al.: Sjögren's syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthr. Rheumat.* 29, 577–586 (1986).
6. FRITZLER, M. J., KINSELLA, T. D.: The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticomplement antibodies. *Am. J. Med.* 69, 520–522 (1980).
7. GALLACCHI, G.: Klinische Bedeutung von antinukleären Faktoren bei der chronischen Polyarthrit. *Akt. Rheumatol.* 9, 86–91 (1984).
8. GERBRACHT, D. D., STEEN, V. D., ZIEGLER, G. L. et al.: Evolution of primary Raynaud's phenomenon (Raynaud's disease) to connective tissue disease. *Arthr. Rheumat.* 28, 87–92 (1985).
9. HARLEY, J. B., ALEXANDER, E. L., BIAS, W. B. et al.: Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthr. Rheumat.* 29, 196–206 (1986).
10. KUMAR, V., BEUTNER, E. H., DABSKI, K. et al.: A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J. Clin. Lab. Immunol.* 15, 163–166 (1984).
11. MEYER, O.: Die Vielfalt der antinukleären Antikörper (ANA) im Verlauf eines Lupus erythematoses disseminatus (LED) und ihre Bedeutung für die Krankheitsprognose. *Eular Bull.* XIII/1, 15–20 (1983).
12. MUNVES, E. F., SCHUR, P. H.: Antibodies to Sm and RNP. Prognosticators of disease involvement. *Arthr. Rheumat.* 26, 848–853 (1983).
13. NAKAMURA, R. M., TAN, E. M.: New developments in autoantibodies to nuclear antigens (ANA) in human diseases (manuscript); in: NAKAMURA, R. M., DITO, W. R., TUCKER, E. S. (eds) *Immunologic analysis: Recent progress in diagnostic laboratory*, Masson Publishing USA, 1981.
14. OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy* 7, 30–154 (1962).
15. REICHLIN, M.: Clinical and immunological significance of antibodies to Ro and La in systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheumat.* 25, 767–772 (1982).
16. SENNEKAMP, J., GENTH, E., WIPPERFÜHR, R., LANGE, C. E.: Immunfluoreszenzserologischer Nachweis von Antikörpern gegen native Doppelstrang-DNS an *Crithidia luciliae*. *Akt. Rheumatol.* 2, 133–138 (1977).
17. SHARP, G. C., IRVIN, W. S., TAN, E. M. et al.: Mixed connective tissue disease. An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Amer. J. Med.* 52, 148–159 (1972).
18. TAN, E. M.: Special antibodies for the study of systemic lupus erythematosus. An analysis. *Arthr. Rheumat.* 25, 753–756 (1982).
19. TAN, E. M., COHEN, A. S., FRIES, J. F. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheumat.* 25, 1271–1277 (1982).
20. TAN, E. M.: Antinuclear antibodies in diagnosis and management. *Hosp. Pract.* 18, 79–84 (1983).

Anschrift der Verfasser:

Dr. med. Günther Haberhauer
2. Med. Abt., Rheumatologie u. Osteologie
Kaiser-Franz-Josef-Spital
Kundratstraße 3
A-1100 Wien, Österreich

ABBOTT Spectrum –

genau richtig für alle Tonarten der schnellen und präzisen Analyse



Das Spectrum überzeugt

durch Flexibilität in der Anwendung:

- 26 frei programmierbare Methoden
- jederzeit Nachforderung von Proben
- STAT-Analysen sofort
- Autodilution
- bidirektionales Interface

durch sichere und einfache Bedienung:

- Tastatur und/ oder Touchscreen-Eingabe, bzw. Übernahme der Anforderungen vom Laborrechner
- Eingabe von Profilen möglich

durch hohe Produktivität:

- 230 Analysen/ Std. ohne ISE, 350 inkl. ISE
- nur 10 min Vorbereitung vor Inbetriebnahme
- Paralleles Arbeiten/ Ausdrucken/ Eingeben

durch Wirtschaftlichkeit:

- typisches Reagenzvolumen 250 µl, integrierte Reagenzkühlung
- typisches Probenvolumen 5 µl
- hohe Produktqualität und zuverlässiger Service

ABBOTT – Das ganze Spectrum klinischer Chemie



ABBOTT Diagnostic
Products GmbH
Max-Planck-Ring 2
6200 Wiesbaden-Delkenheim

Weiterhin der einzigartige Abrechnungskatalog,

- ▶ der schnell informiert, ausführlich kommentiert und die Leistung gebührend honoriert
- ▶ der für jede Gebührenordnungsnummer sinnvolle und ärztlich notwendige Leistungskombinationen aufführt
- ▶ der in Übereinstimmung mit den ärztlichen Prüfungsrichtlinien Leistungsausschlüsse benennt
- ▶ der raschen Zugriff durch thematische, alphabetische und numerische Gliederung garantiert
- ▶ der von Arzt und Helferin gemeinsam benützt werden kann
- ▶ der eine separate Kurzfassung der Leistungslegenden für Schreibtisch und Labor enthält
- ▶ der das Drehbuch für einen beachteten Abrechnungsfilm bildet
- ▶ der Standard, Spektrum und Highlights der Allgemeinärztlichen Gebührenordnung (AGO) berücksichtigt.

7 Verbände						7 Verbände						
BMÄ 87 F GO	Leistungs- schlüssel	Form	Stunde- mögliche Zahlzahl von	Stunde- abgaben	Punkt- wert	BMÄ 87 E GO	Leistungs- schlüssel	Form	Stunde- mögliche Zahlzahl von	Stunde- abgaben	Punkt- wert	
201	Komplexuntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	207	90	0	201	Komplexuntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	207	90
204	Einzeluntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	80	18	100	204	Einzeluntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	80	18
206	Ärztliche DEKULT Verband	206/206/2000- 08 2402 08			86	0	206	Ärztliche DEKULT Verband	206/206/2000- 08 2402 08			86
208	Einzeluntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	116	H		208	Einzeluntersuchung	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	116	H
201	Zahnärztliche	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	208	120	H	201	Zahnärztliche	1	1 8 18 22 05 47 20 206 20 18 02 91 15 01 206 08 0210 11 0208 21 2100 08 2441 48	208	120
208	Stabs- Gebühren	200-200-206		30	30H	31	208	Stabs- Gebühren	200-200-206		30	30H



ZUM EBM-NEU DEN WEBER-NEU!

- ▶ Sämtliche 360 hausärztliche Gebührenordnungsnummern
- ▶ Aufgegliedert nach 33 Leistungsgruppen
- ▶ Gültig für BMÄ '87 und E-GO
- ▶ Aktueller Honorarverteilungsmaßstab
- ▶ Eine Fülle möglicher/sinnvoller Abrechnungskombinationen
- ▶ Hinweise auf gegenseitige Leistungsausschlüsse
- ▶ basierend auf neuester Kassenarztliteratur
- ▶ Abrechnungstechnische Tips und Tricks
- ▶ Spezielle Vertragsbestimmungen
- ▶ Punktwerte und Nummern unter dem Wert einer Beratung
- ▶ Hinweise auf anerkannte und zeitgemäße Behandlungsmethoden
- ▶ Separate, wischfeste Labornummern-Tabelle
- ▶ Alphabetisches Register der Leistungspositionen
- ▶ Numerisch geordneter Leistungskatalog
- ▶ Argumente im Kassenregreß

VERLAG KIRCHHEIM MAINZ
Kaiserstraße 41
6500 Mainz

Bitte senden Sie ... Expl. Weber „Leistung und Gebühren“
43 80 DM an:
Praxisstempel/Unterschrift