

**Dieses Dokument ist eine Zweitveröffentlichung (Verlagsversion) /**

**This is a self-archiving document (published version):**

Mandy Sowa, Kai Großmann, Juliane Scholz, Nadja Röber, Stefan Rödiger, Peter Schierack, Karsten Conrad, Dirk Roggenbuck, Rico Hiemann

**Der CytoBead-Assay – Eine neue Möglichkeit der multiparametrischen Autoantikörperanalytik bei systemischen Autoimmunerkrankungen**

Erstveröffentlichung in / First published in:

*Laboratoriumsmedizin = Journal of laboratory medicine. 2014, 38(6), S. 309 – 317 [Zugriff am: 31.01.2020]. De Gruyter. ISSN 1439-0477.*

DOI: <https://doi.org/10.1515/labmed-2014-0041>

Diese Version ist verfügbar / This version is available on:

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa2-384698>

„Dieser Beitrag ist mit Zustimmung des Rechteinhabers aufgrund einer (DFGgeförderten) Allianz- bzw. Nationallizenz frei zugänglich.“

This publication is openly accessible with the permission of the copyright owner. The permission is granted within a nationwide license, supported by the German Research Foundation (abbr. in German DFG). [www.nationallizenzen.de/](http://www.nationallizenzen.de/)

Mandy Sowa, Kai Großmann, Juliane Scholz, Nadja Röber, Stefan Rödiger, Peter Schierack, Karsten Conrad, Dirk Roggenbuck und Rico Hiemann\*

# Der CytoBead-Assay – Eine neue Möglichkeit der multiparametrischen Autoantikörperanalytik bei systemischen Autoimmunerkrankungen

The CytoBead assay – a novel kind of multiparametric autoantibody analysis in the diagnostics of systemic autoimmune diseases

DOI 10.1515/labmed-2014-0041

Eingang 1.11.2014; Akzeptanz 12.11.2014

**Zusammenfassung:** Bei Verdacht auf Vorliegen einer systemischen Autoimmunerkrankung wird für die serologische Routinediagnostik ein Zwei-Stufen-Verfahren empfohlen. Zuerst werden Autoantikörpern (AAK) mittels sensitiver zellbasierter indirekter Immunfluoreszenz (IIF)-Teste bestimmt. Ein positives Ergebnis muss aufgrund der Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen mit einem weiteren, spezifischen Test bestätigt werden. Dieses sukzessive Vorgehen ist notwendig, da zurzeit keine Assaytechnik die notwendigen Anforderungen an ein einstufiges Verfahren hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erfüllt. Im Sinne einer effektiven AAK-Diagnostik kann heute schon eine simultane Bestimmung von mehreren AAK mittels multiparametrischer Bestätigungstests

die Diagnosefindung im Vergleich zu konventionellen, monoparametrischen Tests wesentlich verkürzen. Jedoch erlauben die verfügbaren multiparametrischen AAK-Nachweismethoden nicht die Kombination von Screening- und Bestätigungstesten. Deshalb wurde basierend auf der digitalen Fluoreszenz mit der hier vorgestellten CytoBead Technologie ein neuer Ansatz entwickelt. Ziel war die Kombination der empfohlenen Stufendiagnostik bestehend aus sensitivem Screening und spezifischer Bestätigungsdagnostik in einer Reaktionsumgebung und darüber hinaus die Möglichkeit der Adaption auf die serologische Diagnostik mehrerer Autoimmunerkrankungen. Durch a) die Nutzung von Standardglasobjektträgern, b) die Kombination von nativen zellulären oder Gewebesubstraten mit antigenbeladenen fluoreszierenden Mikropartikeln (Beads) in einer Reaktionsumgebung, c) die Möglichkeit der manuellen und automatischen Auswertung mittels IIF und d) die Erhebung von quantitativen Fluoreszenzmessergebnissen konnten die Nachteile der bisher bestehenden Testsysteme überwunden werden. Das neue Prinzip ist auf verschiedene multiparametrische AAK-Nachweise wie zum Beispiel die Bestimmung von antinukleären Antikörpern und AAK gegen entsprechende nukleäre und zytoplasmatische autoantigene Zielstrukturen anwendbar. Damit wurde weiterhin die Basis für die simultane AAK-Multiparameterbestimmung für die Serologie der Zöliakie und von ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden geschaffen.

**\*Korrespondenz: Dr. Rico Hiemann,** Fakultät für Naturwissenschaften, Brandenburgische Technische Universität Cottbus – Senftenberg, Großhainer Str. 57, 01968 Senftenberg, Deutschland, Tel.: +49-3573 85823, Fax: +49-3573 85809, E-Mail: Rico.Hiemann@b-tu.de

**Mandy Sowa und Dirk Roggenbuck:** Fakultät für Naturwissenschaften, Brandenburgische Technische Universität Cottbus – Senftenberg, Senftenberg, Deutschland; und GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz/Berlin, Deutschland

**Kai Großmann und Juliane Scholz:** GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz/Berlin, Deutschland

**Nadja Röber und Karsten Conrad:** Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Deutschland

**Stefan Rödiger und Peter Schierack:** Fakultät für Naturwissenschaften, Brandenburgische Technische Universität Cottbus – Senftenberg, Senftenberg, Deutschland

**Schlüsselwörter:** Autoantikörper; Bestätigungsdagnostik; indirekte Immunfluoreszenz; Mikropartikel; Multiparameterdiagnostik; Screening.

**Abstract:** If there is a suspicion of a systemic autoimmune disease, a two-step assessment of autoantibodies (AAb) is

recommended for the serological diagnosis routine. First, AAb will be determined using sensitive, cell-based indirect immunofluorescence. Then, a positive result must be confirmed with a more specific test due to the possibility of false-positive results. This gradual approach is necessary because there is currently no assay technique that fulfills the requirements for a one-stage procedure for sensitivity and specificity. For effective AAb analysis, simultaneous determination of several AAb with multiparametric confirmatory assays significantly shortens serological diagnosis, compared with conventional monoparametric testing. Yet, currently available multiparametric AAb detection techniques do not offer the combination of screening and confirmatory testing. Thus, a new approach based on digital fluorescence was developed by applying a novel CytoBead technology that is presented here. The aim was to combine the recommended stepwise approach consisting of sensitive screening and confirmation of specific diagnosis in a reaction environment and beyond the possibility of adaptation to the serological diagnosis of several autoimmune diseases. Using standard microscopic glass slides and the combination of native cellular or tissue substrates with autoantigen-loaded fluorescent microparticles (beads) in a reaction environment, along with the possibility of manual and automatic evaluation by IIF and the quantitative measurement of fluorescent signals, the disadvantages of currently existing test systems could be overcome. This novel concept is applicable for the determination of various multiparametric AAb, e.g., the determination of antinuclear antibodies and the corresponding AAb in molecular cytoplasmic and nuclear autoantigenic structures. Further, this becomes the basis for the simultaneous multiparametric AAb determination for the serology of celiac disease or ANCA-associated vasculitides.

**Keywords:** Autoantibody; confirmation testing; indirect immunofluorescence; microparticle; multiparameter diagnostic; screening.

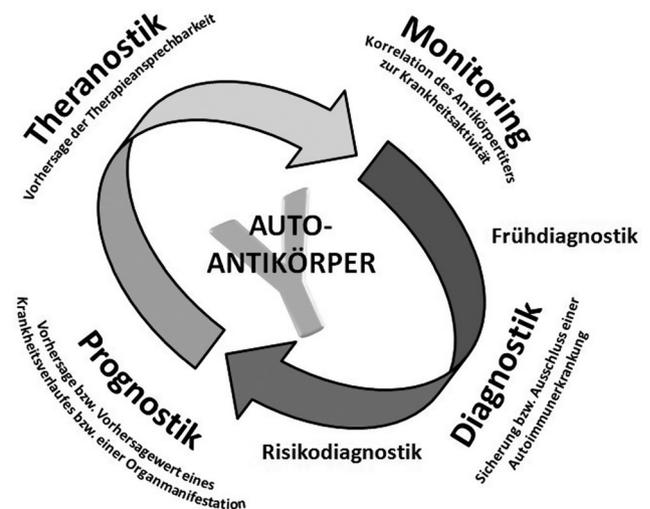
## Einleitung

Die Labordiagnostik von systemischen Autoimmunerkrankungen (SAIE) umfasst die Bestimmung von Entzündungsparametern sowie erkrankungsspezifischen Autoantikörpern (AAK) [1–5]. Während erstgenannte Parameter auf entzündliche Prozesse unabhängig von deren Ursachen hinweisen, können erkrankungsspezifische AAK als Zeichen einer autoimmunen Pathogenese

gewertet werden. AAK können daher richtungsweisend für die Diagnostik und Therapie von SAIE sein [3, 4, 6]. Bei der Mehrzahl der bekannten SAIE sind mehrere AAK mit diagnostischer und/oder prognostischer Relevanz nachweisbar und deren Bestimmung hat Eingang in die Klassifikationskriterien solcher SAIE gefunden [7–9]. Aus Gründen der Kosten- und Zeitersparnis wird heute immer mehr diskutiert, alle für die Erkrankung relevanten AAK in einem Testansatz mittels multiparametrischer Tests zu bestimmen [10–14].

## Bedeutung der multiparametrischen Biomarkeranalytik bei Autoimmunerkrankungen

Aufgrund der großen Variabilität in den klinischen Manifestationen und dem meist langen präklinischen Stadium von SAIE kommt der Biomarkeranalytik eine besondere Bedeutung zu. Die klinische Diagnostik von SAIE wird meist durch einen unspezifischen und variablen Beginn der Erkrankung erschwert. Eine frühzeitige Bestimmung erkrankungsspezifischer AAK (z.B. CCP-AAK bei Verdacht auf rheumatoide Arthritis) kann richtungsweisend für die weitere Diagnostik und Therapie sein (Abbildung 1) [4, 15, 16].



**Abbildung 1** Schematische Darstellung klinischer Relevanz von Autoantikörpern. Erkrankungsspezifische Autoantikörper sind richtungsweisend in der (Früh)Diagnostik der assoziierten Autoimmunerkrankung. Darüber hinaus können sie wertvolle Hinweise bezüglich Erkrankungsentwicklung, Therapieansprechen und Krankheitsaktivität liefern.

Eine Vielzahl der diagnostisch relevanten AAK ist bereits präklinisch nachweisbar [15–18]. Bei simultaner Bestimmung von mehreren AAK mittels multiparametrischer Assays kann die Zeit der Diagnosefindung im Vergleich zur konventionellen Stufendiagnostik verkürzt werden [19, 20]. Mit Zunahme an nachzuweisenden Parametern steigt die Wahrscheinlichkeit, einen möglichen Verdacht auf eine SAIE zu bestätigen bzw. auszuschließen [1, 21].

Neben der Zeiteinsparung sind auch Automatisierbarkeit und (in Abhängigkeit von der technologischen Lösung) die deutliche Kostenreduktion entscheidende Argumente, die für den Einsatz multiparametrischer Testsprechen. Darüber hinaus ergeben sich zahlreiche Vorteile aus klinisch-diagnostischer Sicht. Mit Zunahme der nachzuweisenden Parameter in einem Assay steigt die Sicherheit der Entscheidung bei Verdacht einer SAIE. Die Antigendiversität eines multiparametrischen Assays kann auf alle diagnostischen Fragestellungen angepasst werden und somit u.a. auch eine zuverlässigere Identifizierung von bestimmten Überlappungssyndromen ermöglichen.

## Das Prinzip: Screening und Bestätigung

Der gegenwärtige Standard in der Routinediagnostik bei Verdacht auf Vorliegen einer SAIE (insbesondere einer ANA-assoziierten rheumatischen Erkrankung, AARE) ist die Kombination eines hoch sensitiven Screeningtestes mit nachfolgender Bestimmung der spezifischen Marker-Antikörper [22]. AARE, auch als Kollagenosen bezeichnet, umfassen den systemischen Lupus erythematoses (SLE), die systemische Sklerose (SSc), das Sjögren-Syndrom (SjS), autoimmune Myositiden (AIM) sowie verschiedene Mischkollagenosen (z.B. Sharp-Syndrom). Diese Systemerkrankungen sind charakterisiert durch die Produktion zahlreicher nicht-organspezifischer, vorwiegend antinukleärer (ANA) aber auch antizytoplasmatischer Antikörper, welche mit Ausnahme einiger Myositis-spezifischer AAK mittels Immunfluoreszenzscreening an HEp-2-Zellen erfasst werden [23–27]. In Abhängigkeit von klinischer Fragestellung und Fluoreszenzmuster an HEp-2-Zellen erfolgt danach die Bestimmung der entsprechend relevanten AAK mittels spezifischer Immunoassays. Dieses sukzessive Vorgehen hat gegenüber der solitären Testung von krankheitsassoziierten AAK-Spezifitäten mehrere Vorteile [1, 28]: (a) Bei Negativität im Screeningtest kann eine Reihe von AARE (v.a. SLE und Sharp-Syndrom) relativ sicher ausgeschlossen werden. (b) Der HEp-2-Zell-Assay ermöglicht

ein multiparametrisches hoch sensitives Screening auf mehr als 30 klinisch relevante AAK-Spezifitäten und damit eine Steigerung der Sensitivität der Diagnostik bei AARE mit unabhängig exprimierten Marker-Antikörpern (z.B. SSc). (c) Die Musterdifferenzierung erlaubt neben einer spezifischen Diagnostik (z.B. Anti-Zentromer-Antikörper) zahlreiche Hinweise auf zu Grunde liegende klinisch relevante AAK-Spezifitäten wie dsDNA- und DFS70-Antikörper [29]. (d) Es können klinisch relevante zusätzliche oder gar Zufallsbefunde (z.B. anti-mitochondriale Antikörper bei primär biliärer Zirrhose mit initialen rheumatischen Beschwerden) erhoben werden. (e) Die Screeningbefunde geben Hinweise auf mögliche falsch-positive Ergebnisse in den spezifischen Immunoassays (z.B. positive dsDNA-Antikörper bei negativen ANA) und erhöhen damit die diagnostische Sicherheit.

Die Qualität der Diagnostik wird also durch die Kombination von hoch sensitiven Screening- mit hoch spezifischen Bestätigungstesten gesteigert [30, 31]. Ein hoch sensitiver Screeningassay erfüllt im Wesentlichen die Rolle einer Ausschlussdiagnostik aufgrund seines hohen negativen prädiktiven Wertes [32, 33]. Ein positives Ergebnis gibt andererseits einen wichtigen Hinweis, beweist aber weder das Vorliegen, noch erlaubt es die sichere Diagnose einer Autoimmunerkrankung. Das Screening erfüllt die Bedeutung als Suchtest nach AAK, bei dem ein gewisser Anteil an falsch-positiven Resultaten akzeptiert wird [34]. Bei einem positiven Testergebnis mittels Screeningassay erfolgt die Bestätigung der Verdachtsdiagnose mit einem spezifischem Immunoassay. Der Bestätigungstest besitzt eine wesentlich höhere diagnostische Spezifität und einen höheren positiven prädiktiven Wert als der Suchtest, schließt jedoch falsch positive Befunde nicht aus [35, 36]. In der Notfalldiagnostik bei Nierenmanifestation ANCA-assoziiierter Vaskulitiden ist daher im Interesse einer höchstmöglichen diagnostischen Sicherheit das Screening auf C-/P-ANCA mittels IIF an neutrophilen Granulozyten parallel mit der spezifischen Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO)- und Proteinase 3 (PR3)-ANCA gefordert [1, 4, 33].

## Multiparametrische Nachweismethoden für Autoantikörper

Heute sind zahlreiche multiparametrische Nachweismethoden für Autoantikörper verfügbar, die sich vor allem durch Testmatrix und Messmethode unterscheiden (Tabelle 1). Das Grundprinzip basiert auf immobilisierten Biomolekülen, die über verschiedene Verfahren detektiert werden.

**Tabelle 1** Übersicht multiparametrischer Nachweismethoden für Autoantikörper.

Methoden	Chemolumineszenz	CytoBead	Einzel-ELISA	Mosaik-Biochip	Screen-ELISA	SeraSpot	Streifentest	Zelluläre Assays
Firma	Inova (Bioflash) Menarini (Zeuss)	Medipan (Aktides)	verschiedene	EuroImmun	verschiedene	Serum	verschiedene	verschiedene
Prinzip	Protein beladene Beads	Monolayer aus Zellen/ Gewebe, kombiniert mit Protein beladenen Beads	einzelne Proteine kombiniert in Multiwellplatten	Monolayer aus Zellen/ Gewebe kombiniert mit Proteinspots	Proteinmix in Multiwellplatte	Proteinspots auf Multiwellplatte	Proteinspots auf Membran	Monolayer aus Zellen oder Gewebe
Nachweis	Bestätigung	Screening (Zellen/ Gewebe), Bestätigung (Beads)	Bestätigung	Screening (Zellen), Bestätigung (Proteinspots)	Screening	Bestätigung	Bestätigung	Screening
Methoden- Messsystem	sequentiell Hersteller- spezifisch	parallel manuelles Mikroskop, Aktides	sequentiell ELISA-Reader	parallel manuelles Mikroskop	parallel ELISA-Reader	parallel Hersteller- spezifisch	parallel Scanner	parallel manuelles Mikroskop
Auswertung	automatisch	manuel, automatisch	automatisch	manuel	automatisch	automatisch	manuel, automatisch	manuel automatisch
Ergebnis	quantitativ	semi-quantitativ (Zellen/Gewebe), quantitativ (Beads)	quantitativ	semi-quantitativ	semi-quantitativ	semi-quantitativ	semi-quantitativ	semi-quantitativ
Multiplexgrad	1	variabel	1	variabel, meist <12	hoch	bis 24	variabel, bis 24	sehr hoch (z. B. HEp-2 Zelle: >3000)
Zeitbedarf	~30 min	~1,5 h	variabel, ~2 h	variabel, ~1,5 h	variabel, meist 1–2 h	~2 h	variabel, meist 1–2 h	variabel, ~1,5 h
Literatur	Pelkum et al. 2014 [31]	Sowa et al. 2014 [11]	Sayegh et al. 2014 [37]	Sayegh et al. 2014 [37]				Hiemann et al. 2009 [28]

Hinweis: Real quantitative Messergebnisse sind ausschließlich bei Mitführung von Kalibratoren für jeden Parameter möglich.

## Testmatrix

Eine Testmatrix ist die Unterlage und das Format, auf dem Proteine oder Peptide immobilisiert werden. Am weitesten verbreitet sind Proteinauftragungen in Form von Spots oder Linien auf Membranen – sogenannte Streifen-enteste. Weiterhin können sowohl Multiwellplatten als auch Glasobjektträger mit Proteinen beschichtet werden. Die Vorteile dieser proteinbeladenen Matrizen liegen in der einfachen Handhabung und sehr günstigen manuellen oder automatischen Auswertung über angeschlossene Scanner mit Auswertesoftware. Nachteilig sind Messgenauigkeit aufgrund fehlender Kalibratoren (semi-quantitativ) und niedrige Sensitivität wegen densitometrischer Bestimmung einer Farbumschlagsreaktion. Letzteres konnte von einzelnen Herstellern durch Fluoreszenzmarkierung der Detektormoleküle und der damit verbundenen Lichtquantendetektion verbessert werden.

Alternativ werden Mikropartikel (Beads) aus Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) mit einem Durchmesser bis 20 µm als feste Phase für die Entwicklung der Reaktionsumgebung eingesetzt [13, 14, 19]. Einpolymerisierte Fluoreszenzfarbstoffe sowie verschiedene Beadgrößen erlauben die Unterscheidung einzelner Populationen. Auf der Oberfläche der Beads sind hochgereinigte Autoantigene in natürlicher oder rekombinanter Form immobilisiert. Diese ermöglichen eine spezifische Detektion von AAK. Ein Vorteil der Beads ist, dass einzelne Populationen individuell oberflächenmodifiziert werden können, was spezifische Immobilisierungsstrategien für Biomoleküle generiert. Daraus ergeben sich Möglichkeiten der Reaktionsumgebungsanpassung hinsichtlich Proteinfaltung, aber auch der gezielten Beeinflussung von anderen Leistungsparametern. Aufgrund der geringen Größen sind viele Beads als individuelle Messpunkte kombinierbar und garantieren bei der Messwertberechnung robuste statistische Verteilungen. Die Messung der Fluoreszenz oder auch Chemolumineszenz ist sehr sensitiv und mitgeführte Kalibratoren ermöglichen reale quantitative Messungen über chargenspezifische Kalibrierkurven.

Von Nachteil sind herstellerspezifische Messsysteme, die eine Messung von Testen anderer Anbieter meist nicht ermöglichen. Manuelle Analysen der Bead-basierten Assays waren bislang nicht möglich.

## Messsysteme

Messsysteme für Antikörpernachweise sind Scanner für Farbumschlagsreaktionen auf Streifenentesten,

Durchflusszytometer für Beads sowie Fluoreszenzmikroskope für Proteinspots und Beads.

Scannersysteme sind einfach in der Handhabung und kostengünstig, nachteilig ist jedoch der Charakter der Dokumentation für Streifenenteste. Semi-quantitative Messungen und Analysen sind möglich, die hohe Präzision von Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-basierten Systemen können diese Systeme aufgrund der densitometrischen Auswertung allerdings nicht erreichen.

Zytometer detektieren und messen Beads hinsichtlich Größe und Fluoreszenzintensität im Durchfluss und ermöglichen präzise quantitative Messungen. Die Messung erfolgt in Standardgefäßen oder speziellen herstellerabhängigen Kartuschen sequentiell als Einzelbeads oder als parallele Multiplexmessung der Beadmischung. Ausgewertet wird die Fluoreszenz an der Beadoberfläche, deren Intensität mit der AAK-Konzentration korreliert. Nachteilig sind die hohen Anschaffungskosten für das Messsystem sowie die einmalige Beadmessung, die nicht wiederholt werden kann. Die Möglichkeit, komplexere Autoantigensubstratsysteme z.B. Gewebeschnitte für die AAK-Bestimmung zu verwenden, kann durch das Durchflusszytometer bisher nicht realisiert werden.

Mikroskope, welche manuell oder automatisiert über entsprechende Software gesteuert sind, werden für die Analyse von fluoreszenzbasierten Assays verwendet. Beads und Proteinspots werden auf planaren Oberflächen in Standardformaten wie Multiwellplatten und Glasobjektträger analysiert. Neben artifiziellen Substraten wie antigenbeschichtete Beads sind auch native Substrate wie Zellen und Gewebe, die beim Autoantikörperscreening eingesetzt werden, detektier- und messbar [28, 38]. Die weite Verbreitung der Fluoreszenzmikroskope und die herstellerunabhängigen flexiblen Einsatzmöglichkeiten sind die Hauptvorteile. Quantitative Messungen und die Kontrolle der Probe durch Wiederholungsmessungen sind möglich.

Alle aktuell verfügbaren multiparametrischen Nachweismethoden für den Autoantikörpernachweis erlauben jedoch aufgrund der Beschränkung auf ein Nachweissystem nicht die kombinierte Analytik von Screening- und Bestätigungstest.

## Das CytoBead-Prinzip

Basierend auf den Erfahrungen mit bestehenden Verfahren hinsichtlich der genannten Vor- und Nachteile wurde beim CytoBead-Prinzip eine Weiterentwicklung

angestrebt. Ziel der Entwicklung war ein einfaches Nachweissystem, welches die Stufendiagnostik von AAK mit sensitivem Screening und spezifischer Bestätigungsdiagnostik kombiniert und darüber hinaus auf verschiedene Autoantikörpernachweise adaptierbar macht. Durch Kombination innovativer neuer Ansätze, die im Folgenden beschrieben werden, konnten die Nachteile bestehender Testsysteme überwunden werden.

## Multiple Auftragsstellenkompartimente

Die Stufendiagnostik erfordert den Nachweis der AAK auf unterschiedlichen autoantigenen Substraten. Um eine Kombination dieser Testsysteme zu ermöglichen, wurden einzelne Auftragsstellen auf konventionellen Glasobjektträgern durch Barrieren aus Teflon in Teilkompartimente unterteilt (Abbildung 2A). Somit entstehen Testsysteme für erkrankungsspezifische Kombinationen, die spezifische Nachweissysteme für die Profildiagnostik ermöglichen. Für die Abarbeitung dieses Tests ergeben sich im Vergleich zur konventionellen IIF, z.B. in der ANA- und ANCA-Diagnostik, keine Unterschiede [11]. Die Fluidik des Serum- und Konjugatropfens verhält sich äquivalent zum Standard-Glasobjektträger mit klassischen Auftragsstellen. Der regelmäßige Abstand im 96-Kavitätenraster ermöglicht die manuelle und automatische Testabarbeitung.

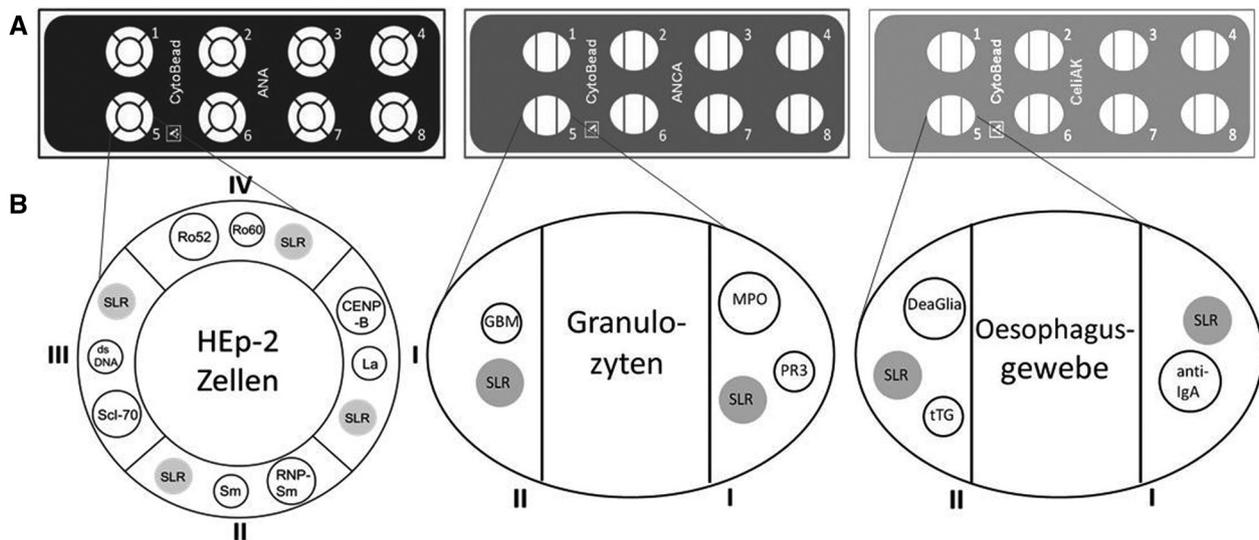
## Zellen, Gewebe + Beads

Die Unterteilung in multiple Auftragsstellenkompartimente ermöglicht die Kombination von verschiedenen Methoden. HEP-2 Zellen werden z.B. beim Nachweis von ANA als sensitives Screeningsystem mit einem Repertoire von mehr als 30 klinisch relevanten Autoantigenen eingesetzt. Darüber hinaus können Granulozyten als Substrat für den ANCA-Nachweis und *Crithidia luciliae* als spezifischer anti-dsDNA-AAK Test genutzt werden [11, 20, 39, 40]. Für den Nachweis von organspezifischen AAK werden Gewebeschnitte von Ratten oder Affen aus Speiseröhre, Leber, Magen oder Niere verwendet als auch rekombinant in Zellen exprimierte Autoantigene [41, 42].

Durch angepasste Oberflächenmodifikationen können im mittleren Kompartiment Zellen oder Gewebeschnitte immobilisiert werden und bilden mit Beads in den äußeren Kompartimenten ein Testprofil. Auf einem Testsystem ist somit sensitives Screening auf nativen Strukturen und spezifische Bestätigung mit Hilfe einer Festphase, den proteinbeladenen Beads, möglich (Abbildung 2B).

## Manuelle und automatische Auswertung

Neue Messmethoden sind meist eng gekoppelt an neue Auswertesysteme, die ein Auslesen der Messdaten



**Abbildung 2** CytoBead Objektträgerausführungen mit 8 Auftragsstellen für unterschiedliche Testprofile.

Kombination aus Screeningtest mit nativem Substrat der Zellen oder Gewebe (Zentrumskompartiment) und artifiziellem Substrat durch Antigen-beladene fluoreszierende Mikropartikel (periphere Kompartimente). CytoBead ANA (links), ANCA (Mitte) und Zöliakie (rechts). SLR ist die Bezeichnung der Referenzbeads für die manuelle Beadklassifikation.

ermöglichen. Hohe Investitionskosten und mangelnder Laborplatz verhindern teilweise die Nutzung neuer Methoden. In fast jedem diagnostischen Autoimmun-Routinelabor ist ein Fluoreszenzmikroskop mit grünem Filter für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verfügbar und wird traditionell zur manuellen, klassischen Analyse der in den 70er Jahren entwickelten IIF-Teste angewendet.

Das neu etablierte Objektträgerformat in Kombination mit einer grünen Fluoreszenz im FITC-Wellenlängenbereich für die Signaldetektion ermöglicht erstmalig die Auswertung von Beadreaktivitäten an konventionellen manuellen Routinemikroskopen. Für diese qualitative bis semi-quantitative Auswertung per Auge ist kein spezielleres Messsystem notwendig. Die Größeneinteilung der rotfluoreszierenden, antigenbeladenen Beads in verschiedene Populationen für die manuelle Bewertung wird durch Referenzbeads unterstützt. Diese homogen grünfluoreszierenden Beads dienen als Größenmaßstab und erlauben die sichere manuelle Identifizierung und Zuordnung.

Die in den letzten Jahren entwickelten Interpretationssysteme für die automatische Analyse von IIF Testen können äquivalent für die Analyse der kombinierten CytoBead-Teste verwendet werden [28, 43–46].

## Quantifizierung

Internationale Vergleichbarkeit von Messergebnissen erfordert kalibrierte Systeme, die semi-quantitative oder quantitative Messergebnisse ausgeben [47, 48]. Für quantitative Analysen sind für den Ausgleich von eventuellen chargenspezifischen und geräteabhängigen Schwankungen Kalibratoren mitzuführen. Daraus ergibt sich, dass manuell ausgewertete Tests und Tests ohne Kalibratoren bestenfalls semi-quantitative Ergebnisse liefern können. Bei manueller Auswertung der CytoBead-Teste sind semi-quantitative Aussagen vergleichbar mit Aussagen von Streifenfesten.

Bei Messungen mit automatischen Systemen wie Aklides (Medipan, Dahlewitz) und der Mitführung von Kalibratoren ist über chargenspezifische Masterkurven eine Ausgabe der Messwerte in internationalen Einheiten (IE/mL) wie bei konventionellen ELISA möglich [11].

Zusammenfassend vereinigt das CytoBead-Prinzip die konventionelle Stufendiagnostik verschiedener Testsysteme in einem Testansatz. Die Auswertung kann sowohl manuell an konventionellen Fluoreszenzmikroskopen als auch an modernen automatisierten Mikroskopen erfolgen. Die automatische Auswertung ermöglicht durch Mitführung von Kalibratoren die Ausgabe von Ergebnissen in

internationalen Einheiten. Das Prinzip ist anwendbar auf verschiedene Autoantikörpernachweise für die serologische Diagnostik von Kollagenosen (ANA-Screening plus Bestimmung Kollagenose-assoziiierter ANA-Spezifitäten), ANCA-assoziierten Vaskulitiden (ANCA-Screening plus Bestimmung der ANCA-Spezifitäten) aber auch organspezifischen Autoimmunerkrankungen (Abbildung 2).

**Interessenkonflikt:** Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehung hin: M. Sowa, K. Grossmann, J. Scholz und D. Roggenbuck sind Mitarbeiter der GA Generic Assays GmbH. Die GA Generic Assays GmbH entwickelt und vertreibt Diagnostika, u.a. Testsysteme zum Nachweis von Autoantikörpern. Aktuelle Forschungsprojekte von R. Hiemann, S. Rödiger und P. Schierack werden von GA Generic Assays unterstützt. Dieses hatte jedoch auf die Planung und das Verfassen des Artikels keinen Einfluss.

## Literatur

1. Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Sack U. Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun Rev* 2012;11: 207–11.
2. Conrad K, Sack U. Multiparameteranalytik in Diagnostik und Monitoring von Autoimmunerkrankungen: Stand und Perspektiven. *J Lab Med* 2011;35:375–82.
3. Chan EK, Fritzler MJ, Wiik A, Andrade LE, Reeves WH, Tincani A, et al. AutoAbSC.Org – Autoantibody Standardization Committee in 2006. *Autoimmun Rev* 2007;6:577–80.
4. Wiik A, Cervera R, Haass M, Kallenberg C, Khamashta M, Meroni PL, et al. European attempts to set guidelines for improving diagnostics of autoimmune rheumatic disorders. *Lupus* 2006;15:391–6.
5. Bizzaro N. Autoantibodies as predictors of disease: the clinical and experimental evidence. *Autoimmun Rev* 2007;6:325–33.
6. Wiik AS. Diagnostische Strategien bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen. *Z Rheumatol* 2007;66:219–4.
7. Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312–8.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271–7.
9. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51:2193–213.
10. Conrad K, Chan EK, Fritzler MJ, Humbel RL, Meroni PL, Shoenfeld Y. From prediction to prevention of autoimmune disease. 2011;7.

11. Sowa M, Grossmann K, Knutter I, Hiemann R, Rober N, Anderer U, et al. Simultaneous automated screening and confirmatory testing for vasculitis-specific ANCA. *PLoS One* 2014;9:e107743.
12. Roggenbuck D, Schierack P, Sack U, Lapin SV, Mazing AV, Totolian AA. Novel methods for autoantibody detection in laboratory diagnostics of autoimmune rheumatic diseases. *Medical Immunology* 2014;16:221–6.
13. Rodiger S, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frommel U, et al. A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2013;133:35–74.
14. Willitzki A, Hiemann R, Peters V, Sack U, Schierack P, Rödiger S, et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:284740.
15. Rantapaa-Dahlqvist S. What happens before the onset of rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:272–8.
16. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R30.
17. Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Dorner T. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009;9:431–5.
18. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:1526–33.
19. Grossmann K, Roggenbuck D, Schroder C, Conrad K, Schierack P, Sack U. Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytometry A* 2011;79:118–25.
20. Knutter I, Hiemann R, Brumma T, Buttner T, Grossmann K, Cusini M, et al. Automated interpretation of ANCA patterns – a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R271.
21. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:494356.
22. Fenger M, Wiik A, Hoier-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, et al. Detection of antinuclear antibodies by solid-phase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem* 2004;50:2141–7.
23. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17–23.
24. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 Cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:166–73.
25. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz an Hep-2-Zellen. *J Lab Med* 2012;36:135–41.
26. Van Blerk M, Van Campenhout C, Bossuyt X, Duchateau J, Hummel R, Servais G, et al. Current practices in antinuclear antibody testing: results from the Belgian external quality assessment scheme. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:102–8.
27. Op de Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Marien G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev* 2011;10:801–8.
28. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, Roggenbuck D, Sack U, Conrad K. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
29. Conrad K, Röber N, Rudorff S, Mahler M. DFS70-Autoantikörper – Biomarker zum Ausschluss ANA-assoziiierter autoimmuner rheumatischer Erkrankungen. *J Lab Med* 2014;38:299–307.
30. Radice A, Bianchi L, Sinico RA. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: methodological aspects and clinical significance in systemic vasculitis. *Autoimmun Rev* 2013;12:487–95.
31. Schulte-Pelkum J, Radice A, Norman GL, Hoyos ML, Lakos G, Buchner C, et al. Novel clinical and diagnostic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *J Immunol Res* 2014;2014:1–13.
32. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Med* 2014;12:38.
33. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–2.
34. Mierau R, Csernok E. Labordiagnostik bei Kollagenosen und Vaskulitiden. *Akt Rheumatol* 2014;39:49–57.
35. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111:507–13.
36. Holle JU, Csernok E, Fredenhagen G, Backes M, Bremer JP, Gross WL. Clinical evaluation of hsPR3-ANCA ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3. *Ann Rheum Dis* 2010;69:468–9.
37. Sayegh J, Poli C, Chevaillier A, Subra JF, Beloncle F, Deguigne PA, et al. Emergency testing for antineutrophil cytoplasmic antibodies combined with a dialog-based policy between clinician and biologist: effectiveness for the diagnosis of ANCA-associated vasculitis. *Intern Emerg Med* 2014. Oct 25. Epub 2014 Oct 25.
38. Hiemann R, Hilger N, Michel J, Nitschke J, Böhm A, Anderer U, et al. Automatic analysis of immunofluorescence patterns of HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:358–71.
39. Roggenbuck D, Conrad K, Reinhold D. High sensitive detection of double-stranded DNA antibodies by a modified Crithidia luciliae immunofluorescence test may improve diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta* 2010;411:1837–8.
40. Conrad K, Ittenson A, Reinhold D, Fischer R, Roggenbuck D, Buttner T, et al. High sensitive detection of double-stranded DNA autoantibodies by a modified Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:180–5.
41. George S, Paulick S, Knutter I, Rober N, Hiemann R, Roggenbuck D, et al. Stable expression of human muscle-specific kinase in HEp-2 M4 cells for automatic immunofluorescence diagnostics of myasthenia gravis. *PLoS One* 2014;9:e83924.
42. George S, Georgi M, Roggenbuck D, Conrad K, Kupper JH. A strategy for cell-based multiplex diagnostics of Myasthenia gravis and autoimmune encephalitis by modifying the subcellular localization of cell membrane autoantigens. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;58:211–28.

43. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: A comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev* 2014;13:292–8.
44. Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, Weyer MG, Buttner T, Radau B, et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R40.
45. Hiemann R, Roggenbuck D, Sack U, Anderer U, Conrad K. Die Hep-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik – Automatisierung und Standardisierung. *J Lab Med* 2011;35:351–61.
46. Bonroy C, Verfaillie C, Smith V, Persijn L, De WE, De KF, et al. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin Chem Lab Med* 2013;1–9.
47. Roggenbuck D, Hiemann R, Schierack P, Reinhold D, Conrad K. Digital immunofluorescence enables automated detection of antinuclear antibody endpoint titers avoiding serial dilution. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e9–e11.
48. Roggenbuck D, Hiemann R, Bogdanos D, Reinhold D, Conrad K. Standardization of automated interpretation of immunofluorescence tests. *Clin Chim Acta* 2013;421C:168–9.