



Autoimmune Lebererkrankungen

Serologische Diagnostik der Autoimmunhepatitis, der primär biliären Cholangitis und der primär sklerosierenden Cholangitis



- IIFT-Leber-Mosaik
- Anti-M2-3E-ELISA, Anti-LKM-1-ELISA, Anti-LC-1-ELISA, Anti-SLA/LP-ELISA
- EUROLINE Autoimmune Lebererkrankungen
- EUROASSAY Leber Profil (Anti-M2, -LKM-1, -LC-1, -SLA/LP)

Autoimmune Lebererkrankungen

Als autoimmune Lebererkrankungen werden hauptsächlich drei verschiedene Krankheitsbilder bezeichnet: die Autoimmunhepatitis (AIH), die primär biliäre Cholangitis (PBC) und die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). Die häufigste der drei Erkrankungen ist die AIH mit einer Prävalenz von 17 Fällen pro 100.000 Einwohnern, gefolgt von der PBC und der PSC. AIH und PBC treten vermehrt bei Frauen im Menopausenalter auf, AIH kann zum Teil auch bei Kindern und jungen Erwachsenen vorkommen. Von PSC sind hingegen vor allem Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren betroffen. In den meisten Fällen lassen sich die drei Erkrankungen durch serologische Untersuchungen gut voneinander abgrenzen. Es treten jedoch auch Überlappungssyndrome (Overlap-Syndrome) auf, bei denen Patienten Anzeichen von zwei autoimmunen Lebererkrankungen zeigen.

Durch den Nachweis von spezifischen Autoantikörpern können autoimmune Lebererkrankungen präzise von infektiösen, toxischen und anderen Formen der Hepatitis differenziert werden. Die AIH ist häufig mit chronisch-entzündlichen rheumatischen Systemerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren-Syndrom und dem systemischen Lupus erythematodes assoziiert. Die Mehrzahl der AIH-Patienten spricht hervorragend auf eine antiinflammatorische oder immunsuppressive Therapie an, welche nach einer eindeutigen Diagnosestellung schnell begonnen werden sollte.

Autoimmunhepatitis (AIH)

AIH ist eine progressive chronische Form der Hepatitis, die in Schüben verläuft und eine Zerstörung der Hepatocyten zur Folge hat. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht geklärt, jedoch werden in diesem Zusammenhang Infektionen mit Hepatitis-Viren, Masernviren, Cytomegalie-Viren oder Epstein-Barr-Viren diskutiert. Einige Patienten zeigen keine bis milde Symptome, jedoch ist auch ein fulminantes Leberversagen möglich. Häufige Beschwerden sind Bauchschmerzen, Juckreiz, Übelkeit, Anorexie und generelles Unwohlsein.

Labordiagnostisch lassen sich bei AIH-Patienten erhöhte Werte für Transaminasen und Bilirubin sowie ein Anstieg der Gesamt-IgG-Titer feststellen. Bei mindestens 80% der AIH-Patienten können zudem Autoantikörper nachgewiesen werden. Anhand dieser kann die AIH in zwei Typen unterteilt werden (s. Tabelle). Eine Abgrenzung von anderen chronischen Hepatitisformen und somit eindeutige Diagnose der AIH ist von entscheidender Bedeutung, da sie unbehandelt mit einer Fünf-Jahres-Mortalitätsrate von 50% assoziiert ist.

Autoimmunhepatitis	
Assoziierte Autoantikörper	Prävalenz
Typ-1-AIH	
ASMA Typ F-Aktin	70–80%
ANA	70–80%
SLA/LP	~20%
Typ-2-AIH	
LKM-1	1–3%
LC-1	1–3%
SLA/LP	~20%

Primär biliäre Cholangitis (PBC)

Die PBC ist durch die progressive entzündungsbedingte Zerstörung der kleinen intrahepatischen Gallengänge gekennzeichnet, die zu einer Cholestase und Fibrose führt. Eine Leberzirrhose und Leberversagen sind mögliche Folgen der Erkrankung. Die Symptome ähneln denen einer AIH sehr. Im Labortest lassen sich bei einer PBC ein Anstieg cholestatischer Enzyme, erhöhte Immunglobulin-Werte (vor allem IgM) und das Auftreten verschiedener Autoantikörper feststellen.

Primär biliäre Cholangitis	
Assoziierte Autoantikörper	Prävalenz
AMA-M2	90–95%
ANA (Nukleäre Punkte): PML, Sp100	25–40%
ANA (Kernmembran): gp210, p62	25–40%

Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die PSC ist eine chronisch-fibrosierende Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallengänge. Im Laufe der Erkrankung entwickelt sich eine Leberzirrhose, die innerhalb von 7 bis 12 Jahren eine Lebertransplantation unumgänglich macht. Etwa 60 bis 80% der PSC-Patienten leiden zusätzlich

Primär sklerosierende Cholangitis	
Assoziierter Autoantikörper	Prävalenz
Atypischer pANCA (DNA-ANCA)	42%

an der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa. Charakteristische, aber keine beweisenden diagnostischen Marker beider Erkrankungen sind atypische (p)ANCA (DNA-ANCA). Circa 5% der Patienten zeigen klinische, laborchemische und histologische Anzeichen, die mit einer PSC vereinbar sind, allerdings bei unauffälligem Cholangiogramm (small-duct PSC).



Diagnostik autoimmuner Lebererkrankungen

Zur Initialdiagnostik ist bei Verdacht ein abdominaler Ultraschall indiziert.¹ Erhöhte Werte für Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Alkalische Phosphatase (AP), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Bilirubin oder Albumin können ebenfalls Hinweise auf eine Erkrankung der Leber geben.¹ Erhärtet sich der klinische Verdacht auf eine autoimmune Lebererkrankung, sollten spezifisch Autoantikörper bestimmt werden. Die serologische Diagnostik der AIH, PBC und PSC umfasst:

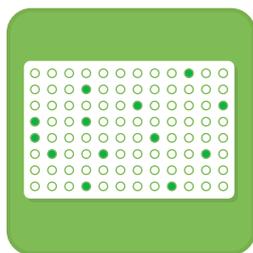
- Quantifizierung der Gesamt-Immunglobuline der Klassen IgG, IgM und IgA zur Abschätzung der selektiven Erhöhung^{1,2}
- Autoantikörpernachweis im Serum mittels IIFT: ^{1,2}
 - ANA, ASMA, AMA und LKM-1 auf dem Dreifach-Rattengewebeschnitt Magen-Leber-Niere
 - PBC-assoziierte ANA gegen Sp100, gp210 und Zentromere mittels HEp-2-Zellen
 - ASMA gegen F-Aktin mittels VSM47-Zellen
 - Anti-SLA/LP-Antikörper mittels transfizierter Zellen
- Monospezifischer Autoantikörpernachweis im Serum mit ELISA oder Immunoblot

Bei positiven serologischen Befunden sollte die Diagnose einer AIH über eine Leberbiopsie verifiziert werden. In der PBC-Diagnostik ist die Biopsie nur bei unklaren Befunden empfohlen.¹ Die internationale AIH-Gruppe (www.iaihg.org) hat vereinfachte Diagnosekriterien für die AIH auf Basis von Antikörpertitern, Histologie und dem Ausschluss viraler Hepatitiden entwickelt.³ Zur Diagnose der pädiatrischen AIH soll ein modifiziertes IAIHG-Punktesystem angewandt werden.¹ Für das AIH-PBC-Overlap-Syndrom fehlt es an allgemein akzeptierten Diagnosekriterien.¹

Serologische Testsysteme zur Diagnostik autoimmuner Lebererkrankungen



Indirekte Immunfluoreszenztests



Monospezifische Tests, wie z. B. ELISA oder Blot

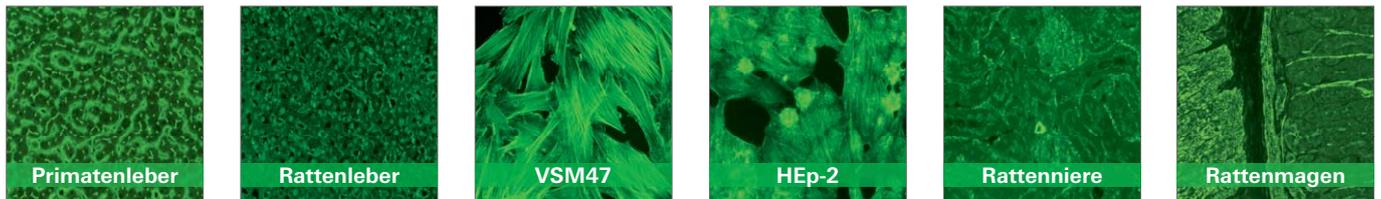


Serologische Diagnostik mittels Immunfluoreszenz

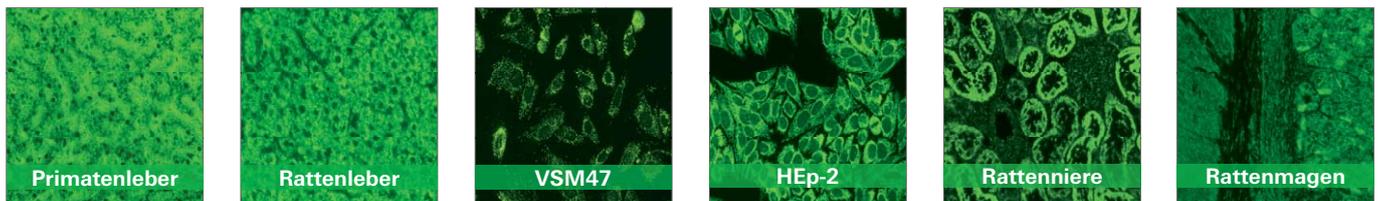
IIFT-Leber-Mosaik

Durch Kombination der IIFT-Substrate HEp-2, Niere, Leber und Magen in einem BIOCHIP-Mosaik können die für die Diagnostik autoimmuner Lebererkrankungen relevanten Antikörper zeitgleich nachgewiesen werden. Positive Proben zeigen spezifische Fluoreszenzmuster u. a. der Zellkerne und Gewebsstrukturen.

Nachweis von ASMA Typ F-Aktin mittels des IIFT-Leber-Mosaik 8: Die IIFT-Substrate Magen und VSM47-Zellen ermöglichen die simultane Detektion und Differenzierung von ASMA Typ F-Aktin und Typ Non-Aktin. Auf dem Substrat Rattenmagen ergeben ASMA eine deutliche cytoplasmatische Fluoreszenz der Tunica muscularis, der Lamina muscularis mucosae und der interglandulären kontraktile Fibrillen der Tunica mucosa. Existieren spezifische Antikörper gegen F-Aktin, zeigt sich eine fibrilläre Fluoreszenz des Cytoskeletts der VSM47-Zellen.



Nachweis von AMA und ANA mittels des IIFT-Leber-Mosaik 8: Für den Nachweis von AMA wird Rattenniere als Standardsubstrat eingesetzt. Das Cytoplasma der proximalen und distalen Tubuluszellen zeigt eine granuläre, basal betonte Fluoreszenz. Die Glomeruli werden durch AMA nur schwach angefärbt. AMA reagieren mit Lebergewebe schwächer und führen zu einer Fluoreszenz der proximalen und distalen renalen Tubuli sowie der Parietalzellen. Lebergewebe und vor allem HEp-2-Zellen eignen sich hingegen besonders gut für Nachweis und Differenzierung von ANA.



Eignung verschiedener IIFT-Substrate zur Bestimmung von spezifischen Autoantikörpern

Antikörper	Substrat							
	HEp-2	SLA/LP transf. Zellen	VSM47	Rattenniere	Rattenmagen	Rattenleber	Primatenleber	Primatenherz
AMA-M2	++	+	+	++	+	+	+	+
AMA-M7	-	-	-	-	-	-	-	++
AMA-M9	+	-	-	-	-	-	-	-
Nukleäre Punkte	++	+	+	+	+	+	++	+
Kernmembran	++	+	+	+	+	+	++	+
Zentromere	++	+	+	-	-	-	+	-
SS-A/SS-B	++	+	+	-	-	-	+	-
Scl-70	++	+	+	+	-	-	+	-
Nukleär homogen	++	+	+	+	+	+	++	+
ASMA Typ Non-Aktin	-	-	-	+	++	+	-	-
ASMA Typ F-Aktin	-	-	++	-	-	-	-	-
LKM	-	-	-	++	-	++	+	-
LC-1	-	-	-	-	-	++	-	-
SLA/LP	-	++	-	-	-	-	-	-

++ gut geeignet, + eingeschränkt geeignet, - nicht geeignet

Monospezifischer Antikörpernachweis mit ELISA und EUROLINE

Anti-M2-3E-ELISA (IgG)

Der Nachweis von AMA ist bei der Diagnose der PBC von großer Bedeutung. Antikörper gegen das M2-Antigen stellen hierbei den diagnostischen Marker mit der höchsten Sensitivität und Spezifität dar. Der Anti-M2-3E-ELISA verwendet den nativen PDH-Komplex und das Designer-Antigen BPO als Antigensubstrat. Die Kombination aus dem künstlichen Polypeptid BPO und nativer PDH erhöht die Sensitivität um 14% gegenüber dem klassischen Anti-M2-ELISA. Die Zielantigene der AMA gehören zur Enzymfamilie der Ketosäuredehydrogenasekomplexe aus der mitochondrialen Atmungskette.

Die Lipoyl-bindenden Bereiche (E2) dieser Enzymkomplexe sind die Hauptautoantigene bei PBC. Das rekombinante Polypeptid His-BPO besteht aus den E2-Untereinheiten des verzweigt-kettigen Ketosäuredehydrogenasekomplexes (BCOAH), der Pyruvatdehydrogenase (PDH) und der Ketoglutaratdehydrogenase (OGDH) sowie einem N-terminalen His-Tag.

Designer-Antigen BPO

(His) ₈	BCOAH-E2	PDH-E2	OGDH-E2
--------------------	----------	--------	---------

Seren von 251 PBC-Patienten, 15 Patienten mit PBC/AIH-Überlappungssyndrom und 1.129 Kontrollprobanden wurden mit dem EUROIMMUN-Anti-M2-3E-ELISA (IgG) untersucht. Die Sensitivität des Anti-M2-3E-ELISA (IgG) für PBC beträgt 93,2% bei einer Spezifität von 97,9%.⁴

Anti-SLA/LP-ELISA (IgG)

Der Anti-SLA/LP-ELISA (IgG) dient der semiquantitativen oder quantitativen In-vitro-Bestimmung humaner Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgG gegen SLA/LP in Serum oder Plasma. Autoantikörper gegen SLA/LP besitzen von allen Antikörpern die für die AIH höchste diagnostische Treffsicherheit.⁵ Das Vorhandensein von Anti-SLA-Autoantikörpern bei AIH-Patienten ist von prognostischer Relevanz, da sie mit einem erhöhten Auftreten von Rückfällen, schlechten Prognosen, Rezidiven nach Lebertransplantation sowie problematischen Schwangerschaftsverläufen assoziiert zu sein scheinen.⁶ Bei AIH treten Anti-SLA/LP-Antikörper in der Regel als einzige Antikörperspezifität auf. Ihre Prävalenz liegt zwar nur zwischen 10 und 30%, der positive prädiktive Wert hingegen bei nahezu 100%. Im Wesentlichen liefert jeder positive Anti-SLA/LP-Antikörper-Befund den Beweis für eine AIH; sofern die entsprechenden klinischen Symptome vorliegen. Anti-SLA/LP-Autoantikörper können nicht durch IIFT auf Gewebeschnitten sicher nachgewiesen werden, sondern nur mittels monospezifischen Tests, wie ELISA, Immunblot oder IIFT mit transfizierten Zellen.

Seren von 454 AIH-Patienten, 147 Patienten mit anderen Lebererkrankungen und 200 Blutspendern wurden mit dem EUROIMMUN-Anti-SLA/LP-ELISA (IgG) untersucht. Die Spezifität des ELISA lag bei 100%.

Anti-LC-1-ELISA (IgG)

Der Anti-LC-1-ELISA (IgG) erlaubt die semiquantitative Bestimmung von Antikörpern gegen LC-1. Anti-LC-1-Antikörper können bei AIH sowohl alleine als auch in Verbindung mit anderen Autoantikörpern auftreten. Besonders bei ansonsten anti-LKM-1-negativer Serologie deuten Anti-LC-1-Antikörper auf Typ-2-AIH hin.

Seren von 93 AIH-Patienten, 183 Patienten mit anderen Lebererkrankungen inklusive PBC sowie 200 Blutspendern wurden mit dem EUROIMMUN-Anti-LC-1-ELISA untersucht. Die Prävalenz der Antikörper gegen LC-1 in dem Autoimmunhepatitis-Kollektiv betrug 5,4%, bei einer Spezifität von 100%.

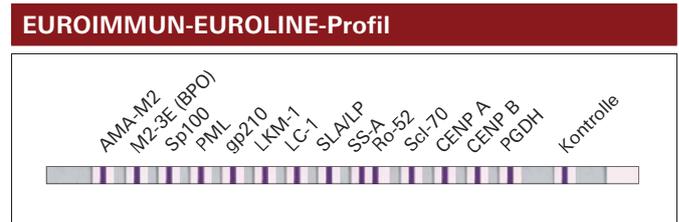
Anti-LKM-1-ELISA (IgG)

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen LKM gehört bei Verdacht auf eine AIH zur Routinediagnostik. Antikörper gegen LKM-1 (Zielantigen: Cytochrom P450 IID6) treten insbesondere bei Kindern auf, während man sie nur bei 1% der erwachsenen AIH-Patienten findet. Auch bei 1 bis 2% der Patienten mit positiver Hepatitis-C-Serologie sind Antikörper gegen LKM-1 nachweisbar. Bei Patienten mit AIH treten Autoantikörper gegen LKM-1 typischerweise nicht gemeinsam mit Antikörpern gegen SLA/LP auf. Durch Testung beider Parameter lässt sich die serologische Trefferquote für AIH erhöhen. Zur Abgrenzung gegenüber einer Virushepatitis ist die parallele Bestimmung der übrigen AIH-assoziierten Autoantikörper zu empfehlen, wie z. B. ANA, pANCA, ASMA oder Antikörper gegen LC-1 und SLA/LP.⁵

18 Seren von AIH-Patienten sowie 489 Seren eines Referenzlabors wurden mit dem EUROIMMUN-Anti-LKM-1-ELISA (IgG) und einem IIFT-Mosaik mit den Substraten Rattenleber und -niere (IgG) als Referenzmethode untersucht. Es ergab sich für den ELISA eine Spezifität von 99,4% bei einer Sensitivität von 100% in Bezug auf den IIFT.

Multiparametrische EUROLINE-Profile

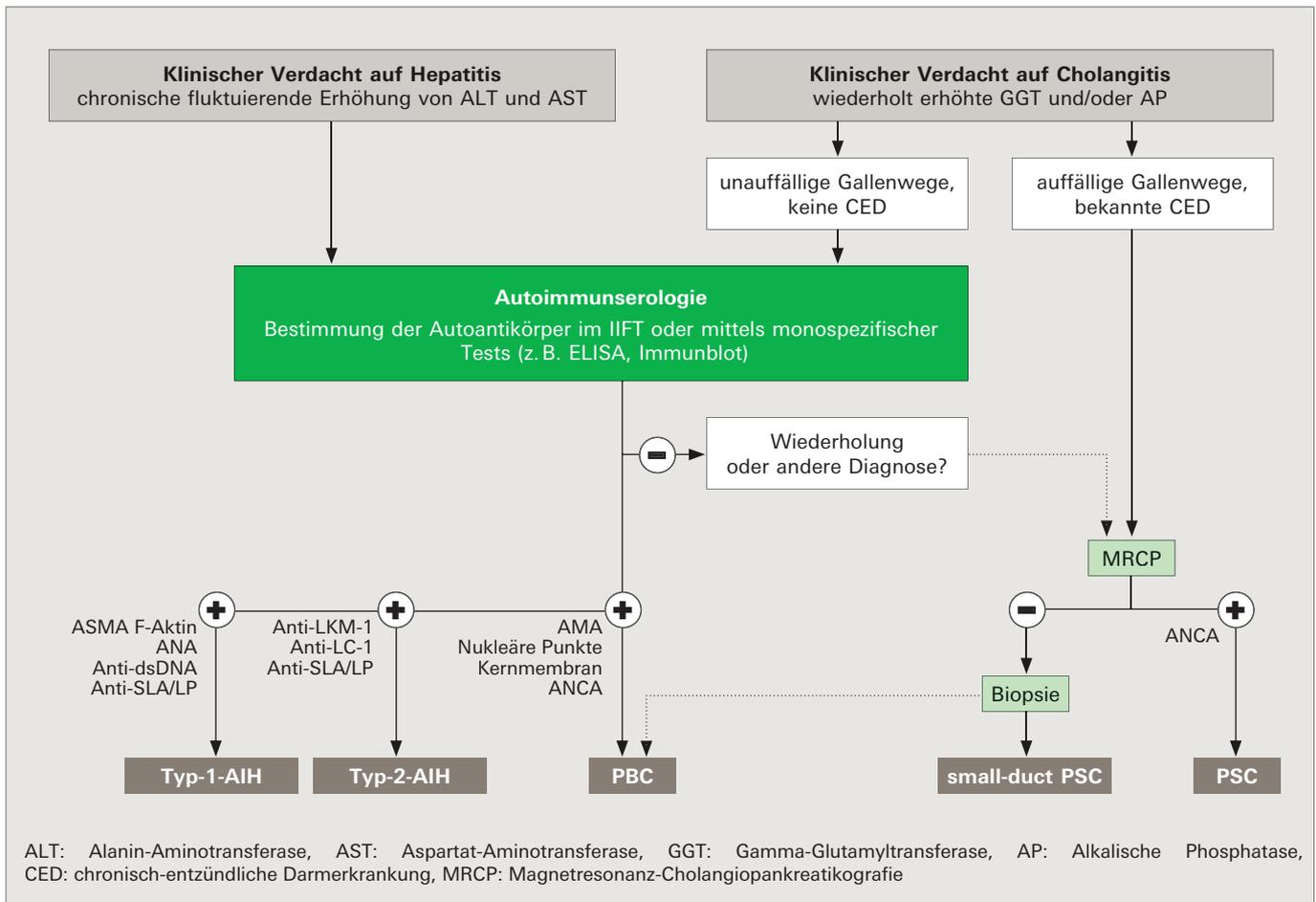
Die EUROLINE-Profile für autoimmune Lebererkrankungen sind qualitative In-vitro-Immunoassays zur Bestimmung von Antikörpern gegen Leberantigene in menschlichem Serum oder Plasma. Sie ermöglichen eine gleichzeitige qualitative Bestimmung mehrerer Antikörper in einer Inkubation.



Das EUROLINE-Profil Autoimmune Lebererkrankungen umfasst neben den AIH- und PBC-spezifischen Parametern auch Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGDH). Die Bestimmung von Antikörpern gegen PGDH erleichtert die Differenzierung der AIH von einer HBV-Infektion. In einer Studie zeigten auf einem EUROLINE 31% der getesteten AIH- und 9% der PBC-, jedoch keine der HBV-Patienten Autoantikörper gegen PGDH.⁷

Villalta und Kollegen testeten in einer Studie zu PBC-spezifischen Autoantikörperprofilen Seren von 58 PBC-Patienten, 144 Patienten mit anderen autoimmunen Lebererkrankungen und 67 Patienten mit chronischen, nichtautoimmunen Lebererkrankungen mit dem EUROLINE Autoimmune Lebererkrankungen Profil 2 und einem IIFT-Mosaik aus HEp-2-Zellen sowie Rattenniere, -leber und -magen.⁸ Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität kommen die Autoren zu dem Schluss, dass der EUROLINE ein gut geeigneter Assay ist zur Bestätigung von IIFT-Ergebnissen oder zur Bewertung von Fällen, in denen das klinische Erscheinungsbild und/oder das serologische Bild uneindeutig sind. In spezialisierten Referenzlaboren, in denen das Vorkommen von PBC-assoziierten Autoantikörpern hoch ist, bietet sich der EUROLINE als Einstiegstest an, um alle relevanten PBC-spezifischen Antikörper gleichzeitig zu untersuchen und die AMA-Subspezifitäten besser und schneller definieren zu können.

Serodiagnostischer Leitfaden für autoimmune Lebererkrankungen



Hinweise zur serologischen Diagnostik

- IgG-Serumspiegel sowie Anti-Aktin-Autoantikörpertiter können mit der Aktivität der AIH korrelieren. AMA-Titer hingegen korrelieren nicht mit der Krankheitsaktivität der PBC.
- Bei akuten/fulminanten Präsentationen einer AIH können Autoantikörper und IgG-Erhöhung fehlen.
- Seren in der IIFT werden normalerweise in einer 1:100-Verdünnung getestet. Antikörpertiter bis 1:80 können bei Erwachsenen häufig auch ohne Autoimmunerkrankung auftreten. Bei Kindern und Jugendlichen können aber auch Titer ab 1:10 klinisch relevant sein.⁵
- Bei der Serodiagnostik der AIH sollte das Thyreoida stimulierende Hormon (TSH) bestimmt werden, da die AIH häufig mit einer Autoimmunthyreoiditis assoziiert ist.¹
- AIH ist darüber hinaus häufig mit chronisch-entzündlichen rheumatischen Systemerkrankungen assoziiert (z. B. systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis, Sjögren-Syndrom).
- Ein positiver AMA-Nachweis im ELISA bei negativer IIFT ist selten, kann aber durch die höhere Sensitivität des ELISA oder das Erkennen von infekassoziert auftretenden AMA erklärt werden.
- Bei Verdacht auf eine PBC empfiehlt sich neben der serologischen Testung auf AMA und ANA auch der Nachweis von ANCA.

Bestellung

Testsystem	Testname	Antikörper gegen	Substrat	Bestellnummer
IIFT	IIFT: Leber-Mosaik	Zellkerne (ANA) Leber-Antigene, Zellkerne (ANA) LKM + Zellkerne (ANA) LKM + Mitochondrien (AMA) Glatte Muskeln Skelettmuskel F-Aktin Lösliches Leber-Antigen/ Leber-Pankreas-Antigen (SLA/LP)	HEp-2-Zellen (Mensch) Leber (Affe) Leber (Ratte) Niere (Ratte) Magen (Ratte) M. iliopsoas (Affe) VSM47-Zellen transfizierte Zellen (EU90)	FA 1300-####-1 bis -21 FA 1710-#### FA 1651-#### FA 1302-####-50
	IIFT: HEp-2/Leber	Zellkerne (ANA) (ANA-Globaltest)	HEp-2-Zellen (Mensch) Leber (Affe)	FA 1510-####-1
	IIFT: Niere	Mitochondrien (AMA)	Niere (Maus)	FA 1621-####
	Anti-M2-IIFT	M2-Antigen	M2-BIOCHIPs (Schwein)	FA 1622-####
ELISA	Anti-M2-3E-ELISA (IgG)	AMA-M2	antigenbeschichtete Mikrotitergefäße	EA 1622-9601 G
	Anti-LKM-1-ELISA (IgG)	LKM-1		EA 1321-9601 G
	Anti-LC-1-ELISA (IgG)	LC-1		EA 1307-9601 G
	Anti-SLA/LP-ELISA (IgG)	SLA/LP		EA 1302-9601 G
EUROLINE	Autoimmune Lebererkrankungen 14 Ag	AMA-M2, M2-3E, sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, SS-A, Ro-52, Sci-70, CENP A, CENP B, PGDH	antigenbeschichtete Teststreifen	DL 1300-####-5 G
	Autoimmune Lebererkrankungen 9 Ag plus F-Aktin	AMA-M2, M2-3E, Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP, Ro-52, F-Aktin		DL 1300-####-9 G NEU!
	AMA-Profil (IgGM)	AMA-M2, M2-3E, M4, M9		DL 1620-####-1 O
EUROASSAY	Anti-LKM-1, Anti-SLA/LP	LKM-1, SLA/LP	antigenbeschichtete Teststreifen	DA 1300-####-1 G



Referenzen

- ¹Strassburg C et al., Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen, AWMF-Reg. Nr. 021-27, Zeitschrift für Gastroenterologie 55(11):1135-1226 (2017)
- ²Vergani D et al., Unusual Suspects in Primary Biliary Cirrhosis, Hepatology 39(1):38-41 (2004)
- ³Hennes E et al., Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis, Hepatology 48(1):169-176 (2008)
- ⁴Dähnrich C et al., New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies, Clinical Chemistry 55(5):978-85 (2009)
- ⁵Terzioli Beretta-Piccoli B et al., Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach, European Journal of Internal Medicine 48:35-43 (2018)
- ⁶Efe C et al., Antibodies to soluble liver antigen in patients with various liver diseases: A multicentre study, Liver International 33(2):190-196 (2013)
- ⁷Xiang D et al., Detection of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis: Clinical significance evaluation, Hepatology Research 41(9):867-876 (2011)
- ⁸Villalta D et al., Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplexed line-blot assay, Clinica Chimica Acta 438:135-138 (2015)