

Manfred Herold*, Werner Klotz, Ulrike Demel, Georg Endler, Ernst Forster, Andrea Griesmacher, Jörg Hofmann, Christina Hübner, Günter Steiner, Sonja Wagner, Ulrich Sack und Karsten Conrad

Internationaler Konsens zur ANA-Bestimmung – was ändert sich im deutschen Sprachraum?

International consensus on ANA determination – what changes in the German-speaking area?

DOI 10.1515/labmed-2015-0025

Eingang 12.2.2015; Akzeptanz 19.2.2015; vorab online veröffentlicht 16.3.2015

Zusammenfassung: 2014 wurden in Zusammenarbeit von zwei großen internationalen Expertengruppen Empfehlungen zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen

***Korrespondenz: Manfred Herold**, Ao. Univ.-Prof. DDR. Manfred Herold, Universitätsklinik für Innere Medizin VI und TILAK LKH Innsbruck, Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck, Österreich, Tel.: +43 512 504 23321, Fax: +43 512 504 24213, E-Mail: manfred.herold@i-med.ac.at, manfred.herold@uki.at; und EASI Austria, Wien, Österreich

Werner Klotz: Universitätsklinik für Innere Medizin VI, Innsbruck, Österreich

Ulrike Demel: EASI Austria, Wien, Österreich; und Klinische Abteilung für Rheumatologie und Immunologie, Medizinische Universität Graz, LKH Universitätsklinikum, Graz, Österreich

Georg Endler und Sonja Wagner: EASI Austria, Wien, Österreich; und Gruppenpraxis Labors.at, Wien, Österreich

Ernst Forster: EASI Austria, Wien, Österreich

Andrea Griesmacher: EASI Austria, Wien, Österreich; und Zentralinstitut für med. und chem. Labordiagnostik, LKH Innsbruck, Österreich

Jörg Hofmann: EASI Austria, Wien, Österreich; und Donauespital SMZ–Ost, Wien, Österreich

Christina Hübner: EASI Austria, Wien, Österreich; und Labor Dr. Greiner, Wien, Österreich

Günter Steiner: EASI Austria, Wien, Österreich; und Universitätsklinik für Innere Medizin III, Wien, Österreich

Ulrich Sack: EASI Germany und DGKL-Sektion Immundiagnostik, Deutschland; und Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Institut für Klinische Immunologie, Deutschland

Karsten Conrad: EASI Germany und DGKL-Sektion Immundiagnostik, Deutschland; und Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Deutschland

zelluläre Antigene, herkömmlich als antinukleäre Antikörper bezeichnet, herausgegeben. Die Empfehlungen wurden in einer 25 Punkte umfassenden Tabelle zusammengefasst und in einer weiteren Tabelle jene Muster beschrieben, die von einem Autoimmunlabor erkannt werden sollten. Internationale Empfehlungen haben für zertifizierte Labore Gültigkeit und erfordern ein Überdenken des analytischen Vorgehens. Die österreichische Arbeitsgruppe für Autoimmundiagnostik (<http://www.easi-network.com>) hat sich auf einen Konsens geeinigt, wie im deutschen Sprachraum diese 2014 veröffentlichten Empfehlungen umgesetzt werden könnten.

Schlüsselwörter: ANA; antizelluläre Antikörper; Autoimmundiagnostik; HEp-2-Zellassay; SARD.

Abstract: In 2014, two groups of international experts collaborated in formulating recommendations for the detection of antibodies against cellular antigens, commonly referred to as antinuclear antibodies. These recommendations were summarized in a table with 25 points, and in a second table, patterns were described that should be recognized by an autoimmune laboratory. International recommendations are mandatory for certified laboratories and require a rethinking of the analytical procedure. The Austrian Working Group on Autoimmune Diagnostic (<http://www.easi-network.com>) has come to an agreement how these 2014 published recommendations could be implemented in German-speaking countries.

Keywords: ANA; anti-cellular autoantibodies; autoimmune diagnostics; HEp-2 cell assay; SARD.

Einleitung

Antinukleäre Antikörper (ANA) sind wesentliche Laborbefunde zur Klassifizierung von Autoimmunerkrankungen. Für die Bestimmung von ANA steht eine Reihe von Labortechniken zur Verfügung. Nach der letzten Empfehlung des American College of Rheumatology (ACR) von 2009 wird die indirekte Immunfluoreszenz (iIF) auf HEp-2-Zellen unverändert als Goldstandard empfohlen [1].

Auf der HEp-2-Zelle werden eine Vielzahl von Antigenen exprimiert, gegen die Autoantikörper gebildet werden können [2–4]. Nur ein geringer Teil dieser Autoantikörper ist auch mit bestimmten Erkrankungen (vorwiegend Autoimmunerkrankungen) assoziiert. Zu Beginn der Autoantikörperdiagnostik auf kernhaltigen Zellen wurden die vier Grundmuster homogen, zirkulär, gesprenkelt und nukleolär beschrieben. Inzwischen gilt die HEp-2-Zelle (humane Epithelzelle der Linie 2) als allgemein übliches Substrat zur Bestimmung von ANA. Die HEp-2-Zelllinie stammt ursprünglich von einer Epithelzelle ab, welche aus Tumormaterial eines Patienten mit einem Larynxkarzinom gewonnen wurde [5] und zeichnet sich durch einen großen Zellkern und eine rege Zellteilung aus, sodass in den relativ wenigen Zellen auf einem Objektträgerspot alle Phasen des Zellzyklus gefunden werden können. Durch diese Vorteile der HEp-2-Zelle werden heute wesentlich mehr Fluoreszenzmuster unterschieden [6], die zugehörigen klinisch relevanten Antigene sind weitestgehend definiert. Bei genauerer Analyse werden aber auf der HEp-2-Zelle nicht nur Antikörper gegen Zellkernantigene erkannt, sondern auch Antikörper gegen andere zelluläre Bestandteile, wie zum Beispiel Antigene, die nur in der Zellteilung auftreten oder Strukturen, die nur im Zytoplasma vorkommen. In den vergangenen Jahren hat sich der Begriff antinukleäre Antikörper (ANA) eingebürgert. Es besteht heute aber Einigkeit, dass alle auf einer HEp-2-Zelle erkennbaren Muster beschrieben werden sollten, auch wenn sie nicht strikt einem Zellkern-Antikörper entsprechen.

Die österreichische Arbeitsgruppe für Autoimmundiagnostik (EASI; <http://www.easi-network.com>) hat sich in mehreren Sitzungen dazu entschlossen, die 2014 in englischer Sprache publizierten Empfehlungen [7], an denen auch die deutsche und die österreichische EASI-Gruppe beteiligt waren, auf eine für den deutschen Sprachraum praktikable Version anzupassen. Allgemeine Übereinstimmung war auch gegeben, dass die Musterbeschreibungen in deutscher Sprache erfolgen sollten. Da aber gelegentlich deutsche Bezeichnungen stark von englischen Originalbezeichnungen abweichen, wird im Zweifelsfall in Klammer auch der englische Terminus angegeben, um

jenen Ärzten, die in internationaler Literatur nachlesen wollen, die richtige Fährte zu legen.

Im nächsten Schritt wurden die österreichischen EASI-Empfehlungen einem breiten Publikum im Rahmen der Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC) im November 2014 in Salzburg vorgestellt. Gegen die vereinbarten Änderungen wurden keine Einwände erhoben, die einheitliche deutsche Bezeichnung wurde allgemein positiv aufgenommen.

In einem Treffen mit zwei Vertretern der deutschen EASI-Gruppe sowie der DGKL-Sektion Immundiagnostik (Karsten Conrad, Ulrich Sack) wurde vereinbart, dass die in Österreich getroffenen Empfehlungen in dieser Form mitgeteilt und einem breiten deutschsprachigen Publikum zur Diskussion gestellt werden sollten.

Die internationalen Empfehlungen

Die internationalen Empfehlungen [7], wie Antikörper gegen zelluläre Bestandteile bestimmt werden sollten, wurden tabellarisch in 25 Punkten zusammengefasst. Tabelle 1 gibt die Empfehlungen in deutscher Sprache wieder, wobei leichte Modifikationen nach Meinung der österreichischen EASI-Gruppe vorgenommen wurden.

In Tabelle 2 wurden die Fluoreszenzmuster, die auf der HEp-2-Zelle erkannt werden können, in 4 Rubriken zusammengefasst. Es wird unterschieden zwischen häufig erkannten und weniger häufig erkannten Mustern. Beide Gruppen werden wieder unterteilt in Kern- und zytoplasmatische Muster. Zu den weniger häufigen Mustern zählen auch die Mitosemuster. Die im Original angegebene Unterscheidung in häufig und weniger häufig erkannte Muster wird in der Tabelle beibehalten, auch wenn die Zuordnung nicht immer klar nachvollziehbar ist. Nach einer in mehreren Ländern durchgeführten EASI-Umfrage [8] werden die Zellkern-Muster homogen, gesprenkelt, zentromer und nukleolär von den meisten Laboratorien angegeben. Das zirkuläre Muster oder das Muster viele oder wenig nukleäre Punkte (nuclear dots) werden nach unserer Erfahrung aus österreichischen Ringversuchen meist erkannt. Die Unterscheidung häufig oder weniger häufig erkannte Muster im Rahmen einer Empfehlung symbolisiert aber auch eine gewisse Kompromisslösung, dass ein Labor nicht unbedingt alle Muster erkennen muss. Die Tabelle enthält aber einen Großteil von unterscheidbaren Fluoreszenzmustern, welche auf Autoimmundiagnostik spezialisierte Laboratorien erkennen sollten.

Tabelle 1: Internationale [7] und nach Meinung der österreichischen EASI Gruppe modifizierte Empfehlungen zur Bestimmung von ANA unter Berücksichtigung von erkennbaren anderen antizellulären Antikörpern. Die Diagnose von SARD (systemic autoimmune rheumatic diseases) erfordert eine Gruppe spezifischer Labortests (z.B. ANA, anti-dsDNA- und anti-ENA-Antikörper).

-
1. ANA, anti-dsDNA- und anti-ENA-Tests sollten beim Verdacht auf SARD als auch auf andere Autoimmunerkrankungen in die Diagnostik aufgenommen werden (siehe Tabelle 2).
 2. Der Nachweis von ANA ist der erste Schritt zur Labordiagnose von SARD.
 3. Untersuchungen auf ANA dienen in erster Linie diagnostischen Zwecken und nicht dem Monitoring einer Erkrankung. Eine wiederholte Bestimmung ist nur in Ausnahmefällen, wie zum Beispiel bei Änderung des Krankheitsbildes, sinnvoll.
 4. Die indirekte Immunfluoreszenz (iIF) ist die Referenzmethode zum Screening auf ANA. Alternative Methoden können verwendet werden, allerdings im Bewusstsein, dass die Ergebnisse dieser Assays von jenen der iIF abweichen können. Bei dringendem klinischem Verdacht auf Vorliegen einer SARD sollte bei negativem Ergebnis einer alternativen Methode die ANA-Testung mit der iIF wiederholt werden.
 5. Laboratorien sollten die für das ANA-Screening verwendete Methode am Befund anführen. Soweit vorhanden sind hierzu die einheitlichen LOINC-Codes zu verwenden.
 6. Tests, die auf einer Mischung von definierten Antigenen beruhen, sollten nicht als ANA-Test oder ANA-Screening bezeichnet werden. Eine mögliche Alternativbezeichnung könnte zum Beispiel „Kollagenose-Screening Test“ oder ähnlich sein.
 7. Laboratorien, die in-house entwickelte Assays zur Messung von ANA, anti-dsDNA- und spezifischen ENA-Antikörpern verwenden, sollten diese Assays mit international erhältlichen Standards (z.B. WHO, CDC/IUIS) kalibrieren.
 8. Zum Screening auf ANA mit iIF sollte ein mit Fluorochrom markierter sekundärer anti-human-IgG Antikörper verwendet werden.
 9. Ein korrekter Nachweis von ANA mit iIF ist abhängig von den verwendeten Reagenzien, dem verwendeten Mikroskop und anderen lokalen Faktoren. Deshalb sollte der Screening-Titer in jedem Labor selbst definiert werden. Ein abnormal erhöhter Titer von ANA sollte über der 95% Perzentile einer gesunden Kontrollpopulation liegen. Auf HEP-2-Zellen gilt eine Probenverdünnung von 1:160 als passend, um ANA in einer Population von Erwachsenen, die auf SARD untersucht werden soll, nachzuweisen.
 10. Bei positiven ANA wird empfohlen, das Fluoreszenzmuster und die höchste positive Verdünnungsstufe am Befund anzugeben. Eine Titration auf Verdünnungen über 1:2560 bringt allerdings keine verwertbare Befunderweiterung.
 11. Fluoreszenzmuster sollten nach einer standardisierten Nomenklatur beschrieben werden (Tabelle 2).
 12. Neben den Kernmustern sollten auch zytoplasmatische und mitotische Muster im Befundbericht angegeben und soweit möglich spezifiziert werden (Tabelle 2).
 13. Bei positivem ANA-Resultat sollten bei klinischem Verdacht auf einen SLE auch dsDNA-Antikörper bestimmt werden.
 14. Bei der Messung von anti-dsDNA-Antikörpern zeigt der CLIFT-Assay eine hohe diagnostische Spezifität. Alternative Methoden können eine niedrigere Spezifität aufweisen. In diesem Fall sollten positive Ergebnisse mit diesen Methoden im CLIFT-Assay bestätigt und separat im Befundbericht angegeben werden.
 15. Die zur Messung der anti-dsDNA-Antikörper verwendete Methode sollte im Befundbericht angegeben werden.
 16. Die Ergebnisse der anti-dsDNA-Messung sollten quantitativ oder bei Verwendung des CLIFT-Assays semiquantitativ ausgegeben werden.
 17. Zur Verlaufsbeobachtung der Krankheitsaktivität beim SLE durch quantitative dsDNA-Bestimmung sollte immer die gleiche Methode verwendet werden.
 18. Im Rahmen der diagnostischen Abklärung sollte bei positiven ANA in Abhängigkeit von Fluoreszenzmuster, Titer und klinischer Fragestellung mit spezifischen Tests auf anti-ENA-Antikörper getestet werden.
 19. Die Methode zur Testung auf anti-ENA-Antikörper sollte im Befundbericht angegeben werden. Im Falle einer Diskrepanz zum Ergebnis der Immunfluoreszenz oder der klinischen Verdachtsdiagnose sollte eine ergänzende Methode eingesetzt werden.
 20. Die Ergebnisse der anti-ENA-Antikörpertestung sollte für jeden Antikörper separat angegeben werden (inklusive negativer Ergebnisse). Wenn das negative Ergebnis mit einem Screening-Test ermittelt wurde, sollte mitgeteilt werden, welche Antikörper mit diesem Assay erfasst werden können.
 21. Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Sharp-Syndroms (mixed connective tissue disease, MCTD) sollten die U1nRNP-Antikörper quantitativ gemessen werden.
 22. Bei starkem klinischen Verdacht auf SARD sollte die ärztliche Anforderung von anti-ENA-Antikörpern unabhängig vom Ergebnis des ANA-Tests akzeptiert werden, wie zum Beispiel Anforderungen von Jo-1-Antikörpern bei Verdacht auf autoimmune Myositis, anti-ribP-Antikörper bei Verdacht auf SLE oder anti-SSA/Ro-Antikörper bei Verdacht auf kongenitalen Herzblock, neonatalen Lupus, Sjögren's Syndrom oder subakut kutanen Lupus.
- Aus den Empfehlungen der österreichischen EASI-Gruppe gestrichen:
23. *Jedes Labor sollte den vom Hersteller des ANA Tests empfohlenen Grenzwert (cut-off) verifizieren. Es wird empfohlen, dafür Seren gesunder Personen aus der entsprechenden Region, dem zu erwartenden Alter und Geschlecht des Patientenkollektivs entsprechend zu verwenden. Der cut-off sollte als 95% Perzentile dieses Kontrollkollektivs berechnet werden.*
 24. *Jedes Labor sollte den vom Hersteller der anti-dsDNA und anti-ENA Tests empfohlenen Grenzwert (cut-off) verifizieren. Es wird empfohlen, dafür eine ausreichende Anzahl von Seren von Patienten mit entsprechenden Autoimmunerkrankungen, anderen Erkrankungen und Gesunden zu verwenden. Die cut-offs sollten mit ROC Kurven Analysen ermittelt werden.*
-

Tabelle 2: Erkennbare Muster auf der HEp-2-Zelle angelehnt an die internationalen Empfehlungen von 2014 [7]. Die Tabelle wurde leicht modifiziert und ergänzt mit deutschen Musterbeschreibungen nach Meinung der österreichischen EASI Gruppe.

Muster deutsch	Muster auf HEp-2-Zelle nach Agmon-Levin et al. 2014	Mögliche Zielantigene	relevante Krankheitsassoziationen
Muster im Zellkern	Nuclear patterns		
Häufig erkannte Muster	Most commonly recognised patterns		
homogen	Homogeneous	dsDNA, Histone	SLE, medikamentös induzierter LE
grob granulär (coarse speckled)	Coarse speckled	U1nRNP, Sm	MCTD, SLE
grob granulär (large speckled)		hnRNP und andere nukleäre Matrixproteine	bisher keine
fein granulär (fine speckled)	Fine speckled	Ro/SSA (Ro52, Ro60), La/SSB, Ku, Mi-2	SJS, SLE
zentromer	Centromere	CENP-A/B/C	SSc (v.a. CREST)
nukleolär	Nucleolar	Fibrillarin, PM/Scl, RNA Polymerase I, Th/To	SSc, PM/SSc-Overlap
Weniger häufig erkannte Muster	Less commonly recognised patterns		
zirkulär (glatt membranös)	Peripheral/rim or nuclear envelope	Lamin B-Rezeptor	PBC
zirkulär (punktiert membranös)		gp210 und andere nukleäre Porenkomplex-Antigene	PBC
dicht fein granulär	Dense fine speckled	DFS-70-Antigen (LEDGF)	Ausschluss von SARD
pleomorph granulär (zellzyklusabhängig)	Pleomorphic cell cycle speckled (PCNA)	PCNA	SLE, SSc
nukleolär (schollig)	Nucleolar (clumpy)	Fibrillarin	SSc
nukleolär (granulär)		Topoisomerase-I (Scl-70)	SSc
nukleolär (homogen)		PM/Scl	PM/SSc-Overlap
viele nukleäre Punkte (multiple nuclear dots)	Multiple/few nuclear dots	sp100	PBC
wenig nukleäre Punkte (few nuclear dots)		Coilin-p80	bisher keine
Muster in der Mitose			
Zentriolen positiv	Centrosome/centriole (formerly: spindle apparatus)	Enolase, Ninein, Pericentrin	bisher keine
fein granulär, Spindle (NuMA oder MSA-1) positiv	MSA (mitotic spindle)	Centrophilin	bisher keine
Spindelfasern positiv		hsEg5, Tubulin	bisher keine
Flemming-Körper (midbody oder MSA-2) positiv		Filamin	bisher keine
CENP-F (MSA-3) Muster		CENP-F	Tumore
Muster im Zytoplasma	Cytoplasmatic patterns		
Häufig erkannte Muster	Most commonly recognised patterns		
Zytoplasma dicht granulär (diffuse)	Diffuse	rib-P, Jo-1, andere t-RNA-Synthetasen, SRP	SLE, PM, Anti-Synthetase-Syndrom
Zytoplasma fein granulär (fine speckled)	Fine speckled	Jo-1	Anti-Synthetase-Syndrom
Zytoplasma positiv passend zu AMA		PDH (AMA-M2)	PBC
Weniger häufig erkannte Muster	Less commonly recognised patterns		
Zytoplasma positiv (dots) passend zu anti-Lysosomen	Discrete speckled	Lysosomen, GW-Körper, Endosomen	bisher keine
Golgi-Apparat positiv	Golgi complex	Proteine des Golgi-Apparates	bisher keine
Zytoplasma fasrig positiv (cytoplasmatic fibers)	Cytoplasmic fibres	Aktin, Zytokeratin, Vimentin	AIH (Aktin), sonst bisher keine
Zytoplasma mit rods and rings		IMPDH2, CTPS1	HCV-Infektion unter IFN α -Therapie

Kommentare zu den internationalen Empfehlungen

Im Folgenden wird auf die Empfehlungen des internationalen Konsenses zur ANA-Bestimmung [7] detailliert eingegangen. Durchgeführte Änderungen und Ergänzungen für den deutschsprachigen Raum werden begründet (s. a. Tabelle 1).

Empfehlung 1: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 2: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 3: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 4: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Zur Verlaufskontrolle einer Erkrankung sind ANA ebenso wie die ANA-Titer nicht geeignet. Zwar gibt es einzelne Erkrankungen, für die eine Änderung eines ANA-Titers im Krankheitsverlauf dokumentiert wurde [9], zur Aktivitätsmessung werden aber üblicherweise schneller reagierende akute Phase-Reaktanten verwendet. Die Änderung des Autoantikörper-Titers ist eher von theoretischem Interesse und weniger von praktischer Bedeutung.

Empfehlung 5: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Alternative Methoden sind in der Regel spezifischer aber weniger sensitiv und erfassen nur Antikörper gegen eine bestimmte Anzahl definierter Antigene. Hingegen werden auf der Zelle auch andere Antigene exprimiert und entsprechende Antikörper erfasst. Das bewirkt zum einen die höhere Sensitivität, zum anderen aber die geringere Spezifität der iIF, da auch nicht krankheitsrelevante Autoantikörper gesehen werden.

Empfehlung 6: Wird dem Original entsprechend übernommen und geringfügig ergänzt.

Alternativ zur iIF angewendete Methoden liefern zwar weitgehend übereinstimmende, aber nicht immer idente Ergebnisse. Es ist daher notwendig, dem Zuweiser mitzuteilen, mit welcher Methode auf ANA getestet wurde. Eine mögliche Methodenangabe beim ANA-Screening auf HEp-2-Zellen wäre zum Beispiel ANA (*indir. Immunfluoreszenz*). Die genaue Angabe der Analysenmethode ist auch in anderen Bereichen der klinischen Chemie erforderlich. So wurde bereits 1990 das System der sogenannten LOINC (Logical Observation Identifiers Names and Codes) entwickelt (<http://loinc.org/>). Eine entsprechende Anpassung an bereits vergebene LOINC-Kennzahlen ist in Diskussion.

Empfehlung 7: Wird dem Original entsprechend übernommen und geringfügig ergänzt.

Im Handel ist eine Reihe von alternativen Bestimmungsmethoden zu finden, die als sogenannte ANA-Screens vertrieben werden. Alle diese sogenannten Screening-EIA enthalten eine begrenzte Anzahl von Antigenen und dienen einer selektiven Bestimmung von Autoantikörpern mit bekannter klinischer Bedeutung. Der Name ANA-Screen wird zu Unrecht verwendet, da hier nur auf eine limitierte Anzahl von Autoantikörpern getestet wird. Durch breiten Konsens gestützte Alternativbezeichnungen können derzeit noch nicht vorgeschlagen werden. Bezeichnungen ähnlich „Kollagenose-Screen“ wären eine mögliche Alternative. Die Bezeichnung ANA-Screen sollte auf die Autoantikörpersuche auf HEp-2-Zellen begrenzt bleiben.

Empfehlung 8: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 9: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Mischkonjugate welche Antikörper vom Typ IgG und IgA und IgM erfassen, werden in der indirekten Immunfluoreszenz zum Teil angewendet. In der Diagnostik von ANA ist aber die Bedeutung von Autoantikörpern vom Typ IgM und IgA unklar [3, 4, 10, 11].

Empfehlung 10: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Jedes Labor muss selbst entscheiden, ab welcher Titerhöhe ein Befund als potentiell pathologisch zu werten ist. Eine Titerhöhe von 1:100 wird allgemein als obere Norm akzeptiert. Das Evaluieren eines 95% Vertrauensintervalls einer gesunden Vergleichspopulation ist theoretisch das richtige Vorgehen, praktisch aber kaum durchführbar. Die Teilnahme an nationalen und internationalen Ringversuchen erscheint uns eher als praktikabler Weg, die Richtigkeit der eigenen Analytik zu überprüfen und den Grenzwert zwischen normal und pathologisch erhöht zu definieren.

Empfehlung 11: Die Empfehlung kann nur mit Ergänzung akzeptiert werden.

Ein Titrieren bis zur höchsten positiven Verdünnungsstufe war früher üblich. Die Erfahrung hat aber gezeigt, dass es keine verwertbare Befunderweiterung bringt, wenn eine Probe bis zur letzten erkennbaren Titerstufe verdünnt wird. Angepasst an die in Österreich in vielen Laboratorien übliche Routine wurde der Kompromiss dahingehend geschlossen, dass wir eine Verdünnung bis zu einer Titerstufe von 1:2560 als ausreichend empfinden. Auch eine niedrigere Titerstufe kann als Endtiter akzeptiert werden. Wesentlich ist die Unterscheidung, ob der Autoantikörper positiv oder stark positiv ist. Wir

erachten einen Nachweis bei der Verdünnung von größer als 1:640 für einen hochpositiven Autoantikörperbefund.

Empfehlung 12: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Allerdings gibt es noch keine ausreichenden Beschreibungen in Bezug auf definierte Fluoreszenzmuster. Der bisher vorliegende Konsens wird in Tabelle 2 zusammengefasst und im nachfolgenden Absatz diskutiert. Wir möchten aber darauf hinweisen, dass derzeit ein neuerlicher internationaler Arbeitskreis das Thema Fluoreszenzmuster bearbeitet hat und das Ergebnis zur Publikation vorbereitet wird.

Empfehlung 13: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 14: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Falls dem Labor die klinische Verdachtsdiagnose eines SLE bekannt ist, kann die ergänzende Untersuchung auf dsDNA-Antikörper sinnvoll sein, weil dsDNA-Antikörper in der Zuordnung der Symptome ein ergänzendes Kriterium für SLE bilden [2, 12, 13]. Aus analytischer Sicht passt zum dsDNA-Antikörper ein homogenes Muster in der iIF. Inwieweit bei positiven aber nicht homogenem ANA-iIF ein positiver dsDNA-Antikörperbefund im ELISA von Bedeutung ist, kann derzeit nicht eindeutig beantwortet werden [10, 14]. Jedoch sind im ELISA positive dsDNA-Antikörper bei nicht passendem iIF-Befund in der Regel nicht mit SLE assoziiert, sondern bei anderen Erkrankungen (z.B. multipler Sklerose) zu finden.

Empfehlung 15: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Allerdings wurde der FARR-Assay herausgenommen, da dieser in Österreich nicht mehr verwendet wird. Für Deutschland besteht hier noch Diskussionsbedarf, da an der Überlegenheit bezüglich SLE-Diagnostik gegenüber den ELISAs kein Zweifel besteht. Der FARR-Assay sollte daher zumindest in spezialisierten Autoimmunlaboren als ergänzende Methode eingesetzt werden.

Empfehlung 16: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 17: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 18: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 19: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 20: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 21: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlung 22: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Ein hochtitrig und als einziger Autoantikörper vorliegender U1nRNP-Antikörper [15] ist das serologische Zeichen der Mischkollagenose (mixed connective tissue disease, MCTD; Sharp-Syndrom). Es darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass neben dem Sharp-Syndrom weitere Mischkollagenosen existieren, welche eine andere Autoantikörper-Analytik (z.B. Bestimmung von Ku- oder PM-Scl-Antikörper) erfordern.

Empfehlung 23: Wird dem Original entsprechend übernommen.

Empfehlungen 24 und 25: Werden wegen fehlender Durchführbarkeit im Routinelabor gestrichen (sollten aber für immunologische Speziallabors gültig sein).

Diese abschließenden Empfehlungen sind verständlich und es ist nachvollziehbar, dass sie in einer allgemein gültigen Richtlinie angeführt werden. Im Rahmen der üblichen Laborarbeit sind diese Empfehlungen aber kaum umzusetzen. Auch in der Originalarbeit wurde darauf hingewiesen, dass sich die beiden Expertengruppen IUIS und EASI in der Zustimmung zu diesen Empfehlungen signifikant unterscheiden.

Wir haben in einer eigenen, den Empfehlungen entsprechenden Untersuchung den bei uns gültigen Normwert des ANA-Titers überprüft [16]. Seit der grundlegenden Arbeit von Eng Tan und Mitarbeiter 1997 [17] gilt eine Probenverdünnung von 1:100 als der optimale Grenzwert, um Patienten mit SLE von gesunden Vergleichspersonen zu unterscheiden. Dieser Grenzwert wurde allgemein akzeptiert und gilt seither als die obere Normgrenze des ANA-Titers im serologischen Screening bei Verdacht auf eine Autoimmunerkrankung. Wir haben diesen Grenzwert mit Seren von bekannten SLE-Patienten im Vergleich zu Gruppen von Patienten mit nichtentzündlich rheumatischen Erkrankungen sowie einer Gruppe von gesunden Blutspendern überprüft. Obwohl wir im Vergleich zu den Untersuchungen von 1997 vermutlich bessere HEp-2-Zellen, ein anderes Konjugat und mit Sicherheit ein lichtstärkeres Fluoreszenzmikroskop verwenden, kommen wir zum gleichen Ergebnis. Es ist anzunehmen, dass die kommerziell erhältlichen Reagenzien durchwegs darauf abgestimmt sind, dass in den meisten Laboratorien die Serumverdünnung von 1:100 als pathologischer Grenzwert angesehen werden kann. Die Überprüfung des Kontrollwertes für jedes Labor und das Errechnen einer 95% Vertrauensgrenze ist praktisch kaum möglich, da sowohl die Patientengruppen als auch die Kontrollgruppen klar definiert sein müssen. Personen, die das Blut für eine solche Studie zur Verfügung stellen, müssen auch mit der zusätzlichen Analyse einverstanden sein und die

genaue Diagnose muss bekannt sein. Diese Voraussetzungen sind nur in den wenigsten Laboratorien gegeben. Unsere Untersuchung wurde in einem Schwerpunkt-krankenhaus durchgeführt, in dem die zuständigen Ärzte auch im Autoimmunlabor mitarbeiten und daher Zugang zu Patienten hatten. Dennoch war das Sammeln von geeigneten Studienpatienten mühselig und langwierig. Aus unserer eigenen Erfahrung sind wir überzeugt, dass kaum ein Labor in der Lage ist, eine eigene Normwertstudie durchzuführen. Aufgrund der Nichtpraktikabilität wollen wir daher die Punkte 24 und 25 nicht empfehlen. Wir glauben vielmehr, dass das einzig praktikable System zur Prüfung der Titerstufen und der richtigen Einschätzung der Höhe eines positiven Befundes die Beteiligung an entsprechenden Ringversuchen ist.

Kommentare zu den Musterbeschreibungen

Das Immunfluoreszenzmuster auf der HEp-2-Zelle spiegelt die topographische Verteilung der Zielantigene wider und gibt Hinweis auf die zu Grunde liegende Autoantikörper-Spezifität. Die hohe Teilungsrate der HEp-2-Zelle und das Vorliegen aller Phasen eines Zellzyklus sind die Voraussetzung, dass die Antikörper gegen unterschiedliche Bestandteile der Zelle binden können und entsprechende Fluoreszenzmuster bewirken. In der ruhenden Zelle sind neben den antinukleären Antikörpern (ANA) auch Muster von antizytoplasmatischen Antikörpern erkennbar. Während den Teilungsphasen werden andere zelluläre Bestandteile gebildet und damit Autoantikörper gegen mitoseassoziierte Antigene in der iIF sichtbar. Für die Summe der Antikörper, die in der iIF auf HEp-2-Zellen erkannt und mit der Anforderung ANA-Test bestimmt werden, wäre die Bezeichnung antizelluläre Antikörper richtig. Unter Rücksichtnahme auf Abrechnungsmodalitäten in den Ländern weltweit ist ein Namenswechsel von ANA auf eine andere Bezeichnung kurzfristig nicht möglich. Es besteht daher Einigkeit, dass der Begriff ANA beibehalten wird, mit der Testanforderung aber alle Muster, die auf der HEp-2-Zelle erkennbar sind, angegeben werden sollen, auch wenn das Muster nicht einem Antikörper gegen Zellkernantigene entspricht.

Tabelle 2 gibt neben den in der Originaltabelle angeführten Musterbeschreibungen unsere vorgeschlagene deutsche Bezeichnung an. Dazu wurden in der Tabelle die dazugehörigen Antigene und die mit diesem Muster und Antikörper am häufigsten in Verbindung stehenden Erkrankungen aus dem Originaltext übernommen und

zum Teil ergänzt [7]. In einzelnen Musterbeschreibungen, in denen der deutsche Ausdruck nicht sicher dem englischen Originalausdruck zugeordnet werden kann, wurde der englische Begriff in Klammer beigefügt. Im Unterschied zur Originaltabelle wurden noch einige wenige Muster ergänzt (so fehlen beispielsweise Mitose-Muster im Originaltext oder wurden fälschlicherweise den Kernmustern zugeordnet), die zwar nicht zwangsläufig von jedem erkannt werden müssen, die aber dem erfahrenen Befunder bekannt sind. Die Tabelle 2 stellt eine derzeit empfohlene Musterbeschreibung dar. In einem neuerlichen Konsensusmeeting im August 2014 in Brasilien wurde versucht, die Musterbeschreibungen eindeutig zu formulieren und Hinweise für die Musterdefinitionen zu geben. Die Zusammenfassung dieses Konsenses ist in Arbeit.

Diskussion

Die Autoantikörperdiagnostik hat sich in den letzten Jahrzehnten eindrucksvoll weiterentwickelt, wenngleich die Grundmethode der indirekten Immunfluoreszenz beibehalten wurde. Auf den ursprünglich verwendeten Organschnitten mit ruhenden kernhaltigen Zellen wurden vier Grundmuster beschrieben. Mit der Einführung der sich schnell teilenden HEp-2-Zelle als Substrat wurden zunehmend mehr Muster und dazugehörige Autoantikörper beschrieben. Der Befund, der mit der HEp-2-Zelle als Substrat erhoben wird, ist mit der Bezeichnung ANA sachlich nicht richtig angegeben. Es sollten neben den typischen, nur gegen Antigene des Zellkerns gerichtete Antikörper (= ANA), auch Muster von Antikörpern beschrieben werden, die gegen andere Zellkompartimente (z.B. bestimmte Organellen) gerichtet sind wie Strukturen des Zytoplasmas, der Kernmembran oder der sich teilenden Zelle. Solche Antikörper können bei Erkrankungen wie autoimmunen Myopathien, der primär biliären Leberzirrhose oder dem SLE diagnostische Bedeutung haben.

In einem zertifizierten Labor können Empfehlungen, die durch international anerkannte Expertengruppen herausgegeben werden, nicht ignoriert werden. Die österreichische EASI-Gruppe hat sich daher bemüht, die 2014 veröffentlichten Empfehlungen an österreichische Verhältnisse anzupassen. Aus Zeitgründen war eine Abstimmung mit der deutschen EASI-Gruppe sowie der DGKL-Sektion Immundiagnostik bisher nicht möglich. Wir möchten ausdrücklich betonen, dass die vorliegenden Überlegungen und Korrekturen zur Antikörperdiagnostik auf HEp-2-Zellen eine vorläufige Stellungnahme darstellt als Grundlage für eine breite Diskussion, um auch für den deutschen Sprachraum einen gültigen Konsens zu finden.

Internationale Empfehlungen werden in der englischen Sprache herausgegeben, Übersetzungen und klare Empfehlungen in andere Sprachen fehlen. Die Folge sind zumeist unterschiedliche Ausdrucksweisen für die Musterbeschreibungen. In Österreich werden häufig deutsche und englische Bezeichnungen vermischt, vor allem dann, wenn für den englischen Ausdruck kein eindeutiges und allgemein benütztes Eigenschaftswort greifbar ist. Die österreichische EASI-Gruppe hat sich bemüht, eine deutsche Formulierung zu finden, um eine landesweit einheitliche Befundausgabe zu erleichtern.

Neben sprachlichen Formulierungen sind noch andere Probleme zu berücksichtigen. In Tabelle 2 werden viele Muster angegeben, die von erfahrenen Befundern erkannt werden können. Das soll aber nicht bedeuten, dass ein Routinelabor auch alle Muster erkennen muss. Wichtig ist das Urteil, ob ein Autoantikörper in krankheitsrelevanter Konzentration vorliegt oder nicht. Darauf beruht auch das Prinzip von automatischen Lesegeräten für iIF, mit denen in erster Linie negative Proben richtig erkannt werden sollten, um Zeit und überflüssige Analytik einzusparen [18]. Für den interessierten Befunder und Befundempfänger dürfte die Tabelle 2 aber eine nützliche Hilfe darstellen.

Ein weiteres Problem für eine genaue Befundausgabe ergibt sich durch die Verwendung von unterschiedlichen Computersystemen und verwendeten Softwareprogrammen für die Befundausgabe. Die Anzahl der Zeichen, die für einen Befund zur Verfügung stehen, ist meist limitiert und es ist schwierig, neben dem Muster und der verwendeten Methode auch noch den englischen Ausdruck anzugeben. Dieses Problem muss ein Labor für sich selbst entscheiden und Wege suchen, um den Empfehlungen so weit wie möglich nachkommen zu können.

Zusammenfassend kann die Umsetzung internationaler und nationaler Empfehlungen von Expertengremien wesentlich zur Harmonisierung der Autoimmundiagnostik beitragen, ersetzt aber nicht die enge Kooperation zwischen Labor und einsendendem Arzt im Rahmen der Befundermittlung und Befundinterpretation.

Literatur

- Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–2.
- Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982;33:167–240.
- Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen [Autoantibody detection by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells]. *Dtsch Med Wochenschr* 2009;134:1278–82.
- Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:166–73.
- Toolan HW. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1. *Cancer Res* 1954;14:660–6.
- Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35:276–90.
- 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 antinuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17–23.
- Damoiseaux J, Agmon-Levin N, van Blerk M, Chopyak V, Eriksson C, Heijnen I, et al. From ANA-screening to antigen-specificity: an EASI-survey on the daily practice in European countries. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:539–46.
- Tan EM. Autoantibodies, autoimmune disease, and the birth of immune diagnostics. *J Clin Invest* 2012;122:3835–6.
- Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71–81.
- Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *Am J Clin Pathol* 2012;137:825–30.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- Petri M, Orbai A, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012;64:2677–86.
- Man A, Shojania K, Phoon C, Pal J, de Badyn MH, Pi D, et al. An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing. *Clin Rheumatol* 2013;32:601–8.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972;52:148–59.
- Klotz W, Herold M. HEp-2 cells cut off: SLE versus non-inflammatory rheumatic diseases. Poster presentation at the 5th Annual Meeting of the Austrian Society for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry (ÖGLMKC). *Clin Chem Lab Med* 2014;52:eA502.
- Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601–11.
- Hiemann R, Roggenbuck D, Sack U, Anderer U, Conrad K. Die HEp-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik – Automatisierung und Standardisierung (The HEp-2 cell as target for multiparametric autoantibody analyses: automation and standardisation). *Lab Med* 2011;35:351–61.