

ist darüber hinaus geeignet, als Verlaufsparemeter herangezogen zu werden, um die Krankheitsaktivität einzuschätzen, und kann als Hilfe bei Therapieentscheidungen dienen.

Beispiel 2: progressiv systemische Sklerose (PSS): nukleäres, nukleoläres oder zentromeres Fluoreszenzmuster

Insgesamt lassen sich bei bis zu 95 % der Patienten mit PSS Autoantikörper nachweisen. Bei der diffusen systemischen Sklerodermie lassen sich mit einer Häufigkeit von bis zu 70 % Antikörper gegen Topoisomerase I (syn. Scl-70) finden. Wesentlich seltener sind Antikörper gegen die nukleolären Antigene Fibrillarin (<3 %) oder PM/Scl-Partikel (8 %; Abb. 1, c). Letztere treten aber auch bei ~50 % der Patienten mit Polymyositis/Sklerodermie-Überlappungssyndrom auf. Bei der limitierten systemischen Sklerose (CREST-Syndrom) finden sich eher Antikörper gegen Zentromeren und hier am häufigsten gegen CENP-B (centromere-protein B; Abb. 1, d). Die einzelnen Spezifitäten schließen sich dabei weitgehend gegenseitig aus.

Beispiel 3: Poly- oder Dermatomyositis (PM/DM): nukleäres oder zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster

Als klassisch unter den Myositis-spezifischen Antikörpern bei Polymyositis sind Antikörper gegen die Histidyl-tRNA-Synthetase Jo-1 und weitere tRNA-Synthetasen (PL7, PL12, OJ, EJ etc., zytoplasmatisch

fein gesprenkelt, Abb. 1, g) zu bezeichnen, vor allem bei Lungenbeteiligung und sog. „mechanic hands“ (sog. Anti-Synthetasesyndrom). Eine klare Zuordnung lässt sich insofern nicht treffen, als verschiedene Antikörper, wenn auch mit unterschiedlicher Häufigkeit, bei den Unterformen der Erkrankung gefunden werden können. Bei der DM können auch Antikörper gegen eine Helicase (Mi-2) gefunden werden, die ein nukleär fein gesprenkeltes Fluoreszenzmuster hervorrufen (Abb. 1, b).

Präanalytik

Die nachzuweisenden Autoantikörper der IgG-Klasse sind bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil. Bevorzugtes Untersuchungsmaterial ist Serum, Analysen sind aber auch aus EDTA- oder Heparinplasma möglich. Das Untersuchungsmaterial kann problemlos per Post verschickt werden. Beim Versand von Vollblutproben ist darauf zu achten, dass das Material nicht einfriert.

Hinweise zu Präanalytik und Abrechnung					
Probenmaterial	1 ml Serum				
Probentransport	Standardtransport				
Methode	IFT				
	EBM		GOÄ	1-fach	1,15-fach
ANA (IFT)	32490*	€ 7,30	3813H2	€ 16,90	€ 19,44
ANA-Titrierung (erfolgt bei positiven ANA automatisch)	32490*	€ 7,30	3840	€ 29,73	€ 34,19

*Ausnahmekennziffer 32023: Rheumatoide Arthritis (PCP) einschließlich Sonderformen und Kollagenosen unter immunsuppressiver oderimmunmodulierender Langzeit-Basistherapie

Autoren:
Blüthner, M.; Volkmann, M., Limbach Gruppe

Literatur:
1. Aruckle MR, McClain MT, Rubertone MV et al.: Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2003; 349: 1526-1533.
2. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C et al.: International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014 Jan; 73 (1): 17-23.
3. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG et al.: Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. Front Immunol. 2015 Aug 20; 6: 412.

Stand: April/2018

Ihr Ansprechpartner:
Fachärzte für Laboratoriumsmedizin
Abteilung Immunologie
E-Mail: info@labor-gaertner.de
Telefon: +49 751 502 0

ANA in der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen

Übersicht unter Berücksichtigung der neuen internationalen Nomenklatur

Klinische Bedeutung

Die klassische Bezeichnung „ANA“ (antinukleärer Antikörper) steht inzwischen als Quasi-Eigennamen für sämtliche Antikörper, die gegen intrazelluläre Strukturen (Kern und Zytoplasma) gerichtet sind. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, hat ein internationales Konsortium eine einheitliche Nomenklatur für die Fluoreszenzmuster auf HEp-2-Zellen empfohlen, die der gestiegenen diagnostischen Bedeutung zytoplasmatischer Strukturen beim indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) gerecht wird, sowie eine Vergleichbarkeit der beschriebenen Muster gewährleistet.

Beim ANA-Test mittels IFT werden im Serum zirkulierende Antikörper gegen körpereigene ubiquitäre Strukturen im Zellkern, aber auch im Zytoplasma, von fixierten HEp-2-Zellen nachgewiesen. Da die Membran vitaler Zellen für zirkulierende Antikörper weitgehend impermeabel ist, spielen die entsprechenden Autoantikörper eher keine pathogenetische Rolle.

Das Wichtigste auf einen Blick

„ANA“ bezeichnet Autoantikörper gegen intrazelluläre Strukturen. Sie werden ausschließlich mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFT) auf fixiertem mitotisch aktivem Zellmaterial bestimmt. Die Fluoreszenzmuster können Rückschlüsse auf die Identität der Zielantigene erlauben. Daher kann die Untersuchung nicht durch Screening-Tests mit einigen ausgewählten Antigenen (Immunoblot, ELISA etc.) ersetzt werden. Solche Tests sollten nur zur Weiterdifferenzierung verwendet werden. Die Antikörperspezifitäten selbst können Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Erkrankungen ermöglichen.

Ihre Bedeutung liegt vielmehr in ihrer diagnostischen Relevanz für systemische Autoimmunerkrankungen, insbesondere für Kollagenosen. Hier sind häufig ANA

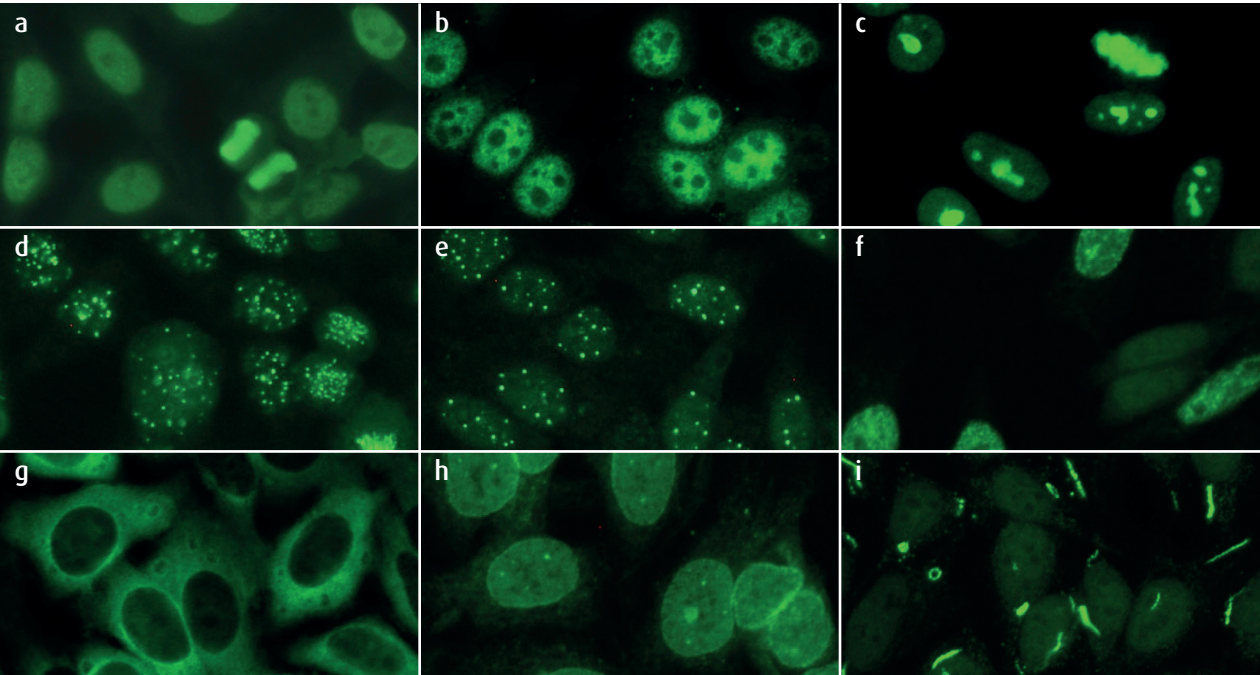


Abb. 1. Beispiele für ANA-Muster: a) nukleär homogen, b) nukleär gesprenkelt, c) nukleolär, d) zentromer, e) nukleäre Punkte (nuclear dots), f) nukleär pleomorph, g) zytoplasmatisch gesprenkelt, h) nukleär membranös, i) zytoplasmatische Stäbchen und Ringe (rods and rings) – © Martin Blüthner

nachweisbar und lassen je nach Art und Titer einen Rückschluss auf die zugrundeliegende Erkrankung zu. Vor allem aber erlaubt die hohe Sensitivität des ANA-Screenings – ca. 98 % z.B. bei systemischem Lupus erythematoses (SLE) – einen weitgehenden Ausschluss der Erkrankung bei negativem Testergebnis.

Die hohe Sensitivität geht allerdings mit einer nur geringen Spezifität einher. Daraus erklärt sich der vergleichsweise niedrige positive prädiktive Wert (PPV) der ANA, der durch eine gute klinische Vorauswahl, also eine strenge Indikationsstellung für die Untersuchung, gesteigert werden muss. Bei der Befundinterpretation muss ferner berücksichtigt werden, dass sich die Autoantikörper zuweilen mehrere Jahre vor dem Auftreten von klinischen Symptomen nachweisen lassen und sich die Spezifität eines ANA-Befunds im Krankheitsverlauf ändern kann.

Bei Kollagenosen werden positive ANA-Befunde, in der Regel mit Titern 1:>320, gefunden. Auch die Differenzierung des ANA-IFT im Hinblick auf die molekulare Identität des Zielantigens kann zur besseren Einschätzung eines positiven Befunds beitragen, da einige Autoantigene eng mit bestimmten Autoimmunerkrankungen assoziiert sind.

Nomenklatur der Zielantigene

Für die Nomenklatur der im ANA-IFT detektierten Zielstrukturen bzw. -antigene konnte, trotz jahrzehntelanger Bemühungen, leider bisher keine verbindliche Einigung gefunden werden. Erstbeschreibungen orientieren sich vielfach an den Initialen der Indexpatienten (Sm, Ro, La), an Abkürzungen der zugrundeliegenden Erkrankungen (Scl-70) oder an der subzellulären Lokalisation des Antigens (CENP-B = centromere protein B). Bei relativ zeitgleicher Entdeckung solcher Antikörper oder auch wegen fehlender Vergleichs- und Identifikationsmöglichkeiten wurden zudem oft unterschiedliche Namen für eigentlich identische Spezifitäten vergeben (SS-A/Ro, SS-B/La). In den 1980er Jahren mit dem Aufkommen der modernen rekombinanten Klonierungsmethoden konnten die Antigene dann molekularbiologisch identifiziert und charakterisiert werden (Scl-70 = Topoisomerase I). Daher werden neben oder statt der individuellen Bezeichnungen der Zielautoantigene oft auch ihre zell- und molekularbiologischen oder biochemischen Identitäten zur Benennung verwendet.

Indikation

Der IFT auf ANA ist indiziert bei klinischem Verdacht auf systemische Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses, progressiv systemische Sklerose, (Dermato-)Myositis, Sjögren (Sicca-)Syndrom, Mischkollagenose sowie bei unklaren Arthritiden und beim Verdacht auf autoimmune Lebererkrankungen (autoimmune Hepatitis, primär biliäre Cholangitis).

Bei bekannter Subspezifität ist der ANA-Titer – mit Einschränkungen – auch zur Verlaufskontrolle verwendbar.

Labordiagnostik und Testprinzip

Beim indirekten ANA-IFT wird mitotisch aktives Zellmaterial nach Fixierung und Permeabilisierung der Membranen auf einem Objektträger mit Patientenserum inkubiert. Antikörper binden dabei spezifisch an ihre intrazelluläre Zielstruktur und werden mittels fluoreszenzmarkiertem Anti-human IgG sichtbar gemacht. Seit den 1990er Jahren hat sich für die Untersuchung die Verwendung der von einem humanen Larynxkarzinom abgeleiteten HEp-2 Zellen durchgesetzt, auf denen auch spezifische nukleäre Details der Teilungsphase gut erkennbar sind. Eine ausschließliche Verwendung von Organ-Gefrierschnitten gilt heute aufgrund der geringeren Sensitivität und der stark eingeschränkten Möglichkeit der Musterzuordnung als nicht mehr zeitgemäß.

Je nach intrazellulärer Verteilung des Antigens entstehen mikroskopisch erkennbare Fluoreszenzmuster, die auf das ursächliche Autoantigen schließen lassen (Abb. 1). Bei positivem Test (Ausgangsverdünnung von 1:80 bis 1:100) wird eine Untersuchung mit serieller Verdünnung des Patientenserums angeschlossen. Die höchste positive Serum-Verdünnungsstufe (Titer) erlaubt den Rückschluss auf die Autoantikörperkonzentration im Serum.

Die Autoantikörper-Diagnostik bei systemischen Autoimmunerkrankungen ist ein mehrstufiger Prozess. Sind in einem ersten Schritt durch den indirekten Immunfluoreszenztest die in Frage kommenden Antigene eingegrenzt, kann die molekulare Spezifität der vorliegenden Autoantikörper in einem zweiten diagnostischen Schritt mit spezifischen Methoden wie Enzymimmunoassay (EIA), Immunoblot oder Immunopräzipitation einzeln und ggfs. semiquantitativ bestimmt werden. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass der Untersucher in der Praxis häufig mit gemischten Mustern konfrontiert ist, die eine genauere Zuordnung schwierig machen können.

Generell folgen die ANA-Muster dem komplexen Aufbau der eukaryoten Zelle. Dies wird bei der Beschreibung der Muster im Befund berücksichtigt. Ein internationales Standardisierungskomitee (ICAP = International Consensus on ANA Patterns) klassifizierte erst kürzlich in einem Positionspapier 28 im Zellkern und im Zytoplasma beobachtbare Muster, die mit einer durchgehenden Nomenklatur bezeichnet werden (Anti-Cellular: AC1–AC28), und die damit erstmalig nach Jahrzehnten eine Vereinheitlichung der Muster darstellen.

Tabelle 1: Korrelation zwischen Mustern, weiterführenden Analysen und möglichen Krankheitsassoziationen			
Übergeordnete Muster*	ICAP-Code	Weiterführende Analysen	Mögliche Krankheitsassoziationen
Nukleär homogen	AC-1	ds-DNA-Ak (CLIFT), ds-DNA-Ak (ELISA), ds-DNA-Ak (Farr RIA), Nukleosomen-Ak, Histon-Ak	SLE, DLE, juvenile idiopathische Arthritis
Nukleär dicht fein gesprenkelt	AC-2	DFS70-Ak	Exklusionsmarker
Zentromer	AC-3	CENP-B-Ak	PSS (vorwiegend limitiert-kutane Formen, CREST), PBC
Nukleär gesprenkelt	AC-4, -5	SS-A-Ak (Ro-52, Ro-60), SS-B-Ak (La), Mi-2-Ak, TIF1-gamma-Ak, Ku80-Ak, U1-nRNP-Ak, Sm-Ak, RA-33-Ak, Scl-70-Ak	SJ, SLE, DM, Mischkollagenose, PSS
Nukleäre Punkte	AC-6, -7	Sp-100-Ak, NXP2-Ak, Coilin-Ak	PBC, entzündliche systemische Autoimmunerkrankungen, DM
Nukleolär	AC-8, -9, -10	PM/Scl-Ak, Th/To-Ak, Fibrillarin-Ak, NOR-90-Ak	PSS, PSS/PM, SJ
Nukleär membranös	AC-11, -12	Lamin-Ak, Lamin-B-Rezeptor-Ak, gp210-Ak	PBC, selten bei: SLE, SJ und seronegativer Arthritis
Nukleär pleomorph	AC-13, -14	PCNA-Ak	Selten bei: SLE und anderen Erkrankungen; Tumor- und anderen hyperproliferativen Erkrankungen
Zytoplasmatisch fibrillär	AC-15, -16, -17	Aktin-Ak	AIH
Zytoplasmatisch gesprenkelt	AC-18, -19, -20	PL7-Ak, PL12-Ak, EJ-Ak, OJ-Ak, KS-Ak, Ribosomales-P-Protein-Ak, Jo-1-Ak	Anti-Synthetase-Syndrom, PM/DM, SLE, juveniler SLE, neuropsychiatrischer SLE, limitierte PSS, idiopathischer Pleuraerguss
Zytoplasmatisch retikulär passend zu AMA	AC-21	AMA-Subtyp M2	Häufig bei: PBC, selten bei: PSS und anderen entzündlichen systemischen Autoimmunerkrankungen
Polar zytoplasmatisch passend zu Golgi	AC-22	Keine spezifischen Tests verfügbar	Keine spezifischen Krankheitsassoziationen
Zytoplasmatisch Stäbchen und Ringe	AC-23	Keine spezifischen Tests verfügbar	Keine spezifischen Krankheitsassoziationen
Mitotisch	AC-24, -25, -26, -27, -28	Keine spezifischen Tests verfügbar	Selten bei: Sklerodermie; Raynaud-Syndrom; Infektionen (Mycoplasmen, Viren); SJ; SLE; Kollagenosen; Malignomen; diskoidem Lupus erythematoses; chronischen lymphatischen Leukämien; Polymyalgia rheumatica

SLE: systemischer Lupus erythematoses, DLE: medikamenten-induzierter Lupus erythematoses, PSS: progressive systemische Sklerose, RA: rheumatoide Arthritis, CREST: Calcinose, Raynaud, Oesophagusdysmotilität, Sklerodaktylie, Teleangiektasien, PBC: primär biliäre Cholangitis, SjS: Sjögren-Syndrom, PM: Polymyositis, DM: Dermatomyositis, PM/Scl: Polymyositis/Sklerodermie-Überlappungssyndrom
*Im ICAP werden mittels gut charakterisierter Seren insgesamt 28 monospezifische Muster auf HEp2-Zellen beschrieben. Da diese in der täglichen Laborroutine selten in Reinform auftreten, wurden übergeordnete Muster definiert, die alternativ zur ICAP-Bezeichnungen im Befund verwendet werden.

Die in Abbildung 1 dargestellten Fluoreszenzbefunde stellen Beispiele für wesentliche relevante Muster dar, ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Häufige Zielstrukturen der ANA sind u.a. die als ENA (extrahierbare nukleäre Antigene, extractable nuclear antigens) bekannten diagnostisch relevanten Spezifitäten (z. B. nRNP, Sm, Scl-70, SS-A/Ro, SS-B/La). Aber auch weniger häufige Antigene können wichtige diagnostische Marker sein. Diese können im IFT, der naturgemäß alle relevanten Kernstrukturen im Untersuchungssubstrat enthält, in der Regel erkannt, wenn auch nicht immer direkt zugeordnet werden. Insofern sollte der Terminus „ANA-Screening“ dem IFT vorbehalten und von Untersuchungen abgegrenzt werden, die auf einer Mischung einzelner relevanter Antigene beruhen.

Beispiele für mögliche Weiterdifferenzierungen in der Diagnostik von systemischen Autoimmunerkrankungen

Beispiel 1: systemischer Lupus erythematoses (SLE): nukleär homogenes Fluoreszenzmuster

Der SLE ist die häufigste Kollagenose in der westlichen Welt. Nach derzeit gültigen Empfehlungen (Systemic Lupus International Collaborating Clinics [SLICC] – Klassifikationskriterien, 2012) gehören ein positiver ANA-Befund, sowie der Nachweis von Antikörpern gegen ds-DNA, Sm und/oder gegen Phospholipide zu den immunologischen Kriterien beim Nachweis eines SLE. Antikörper gegen ds-DNA führen zu einem charakteristischen nukleären homogenen Fluoreszenzmuster (Abb. 1, a). Der Spiegel der ds-DNA-Antikörper