Dieses Dokument ist eine Zweitveröffentlichung (Verlagsversion) /

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

Karsten Conrad, Nadja Röber, Sebastian Rudolph, Michael Mahler

DFS70-Antikörper – Biomarker zum Ausschluss ANA-assoziierter rheumatischer Erkrankungen

Erstveröffentlichung in / First published in:

Laboratoriumsmedizin = Journal of laboratory medicine. 2014, 38(6), S. 299– 307 [Zugriff am: 31.01.2020]. De Gruyter. ISSN 1439-0477.

DOI: <https://doi.org/10.1515/labmed-2014-0042>

Diese Version ist verfügbar / This version is available on:

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa2-385589>

„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/

Karsten Conrad*, Nadja Röber, Sebastian Rudolph und Michael Mahler

DFS70-Antikörper – Biomarker zum Ausschluss ANA-assoziiierter rheumatischer Erkrankungen

DFS70 antibodies – biomarker for exclusion of ANA associated rheumatic diseases

DOI 10.1515/labmed-2014-0042

Eingang 10.11.2014; Akzeptanz 11.11.2014

Zusammenfassung: Trotz aller Fortschritte bei der Etablierung spezifischer Autoantikörperassays ist das Screening auf antinukleäre Antikörper (ANA) mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen für eine qualitätsgerechte Labordiagnostik von ANA-assoziierten rheumatischen Erkrankungen (AARE) weiterhin unabdingbar. Mit den Erkenntnissen zur Relevanz von DFS-Mustern und DFS70-Antikörpern eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Optimierung der serologischen Stufendiagnostik bei Verdacht auf AARE. Das dicht-feingranuläre („dense fine speckled“, DFS) ANA-Muster ist relativ gut von den klassischen, mit dsDNA-Antikörpern assoziierten „homogenen“ ANA-Mustern differenzierbar. Die wichtigste bei diesem Muster nachweisbare ANA-Spezifität ist der DFS70-Antikörper (Synonym: LEDGF-Antikörper). Dieser Antikörper ist auch die häufigste bei ANA-positiven gesunden Personen nachweisbare ANA-Spezifität. Die Prävalenz von DFS70-Antikörpern in AARE-Patienten ist signifikant niedriger im Vergleich zur Prävalenz bei ANA gesunden Personen. Es besteht eine negative Assoziation der DFS70-Antikörper mit AARE, insbesondere wenn der Antikörper nicht in Begleitung von klinisch relevanten Autoantikörpern vorliegt. Isolierte DFS70-Antikörper findet man in weniger als 1% der AARE, aber in 5%–11% bei gesunden Personen. Beim Vorliegen eines isolierten DFS70-Antikörpers verringert sich die post-Test-Wahrscheinlichkeit für eine AARE deutlich. DFS70-Antikörper sind daher wertvolle

neue Biomarker zur besseren Interpretation positiver ANA bei Negativität für AARE-assoziierte Autoantikörper und sollten in modifizierte Testalgorithmen zur Vermeidung unnötiger Überweisungen und Folgeuntersuchung von ANA positiven Personen integriert werden.

Schlüsselwörter: antinukleäre Antikörper (ANA); ANA-assoziierte autoimmune rheumatische Erkrankungen; DFS70-Antikörper.

Abstract: Despite the progress in the establishment of specific autoantibody assays, screening for antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells for quality-oriented laboratory diagnosis of ANA-associated rheumatic diseases (AARD) remains indispensable. Research results on the relevance of DFS pattern and DFS70 antibodies disclosed novel possibilities to optimize the serological stepwise diagnostics of AARD. The “dense, fine speckled” (DFS) pattern on HEp-2 cells is well differentiated from the classic “homogeneous” ANA pattern associated with dsDNA antibodies. In DFS pattern positive sera the most important detectable ANA specificity is the DFS70 antibody (synonym LEDGF antibody). This antibody is also the most frequent ANA specificity in ANA positive healthy persons. The prevalence of DFS70 antibodies in AARD patients is significantly lower compared with the prevalence in ANA-positive healthy persons. There is a negative association between DFS70 antibodies and AARD, especially if no concomitant AARD-specific autoantibodies are found. Isolated DFS70 antibodies are detectable in <1% of AARD, but are detectable in 5%–11% of healthy persons. In the presence of an isolated DFS70 antibody, the posttest probability for AARD is reduced significantly. DFS70 antibodies are valuable novel biomarkers for better interpretation of positive ANA in cases of negative AARD-associated autoantibodies and should be integrated in modified test algorithms to avoid unnecessary referrals and examinations of ANA-positive persons.

***Korrespondenz:** PD Dr. med. Karsten Conrad, Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, 01307 Dresden, Fetscherstraße 74, Deutschland, Tel.: +49-351 458 6540, Fax: +49-351 458 6308, E-Mail: karsten.conrad@tu-dresden.de

Nadja Röber: Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Dresden, Deutschland

Sebastian Rudolph: ADMEDIA MVZ GmbH, Waldenburg, Deutschland

Michael Mahler: INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA 9213, USA

Keywords: antinuclear antibodies (ANA); ANA-associated autoimmune rheumatic diseases; DFS70 antibodies.

Einleitung

Die Bestimmung antinukleärer Antikörper (ANA) mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) mit HEp-2-Zellen ist seit Jahrzehnten Standard in der Labordiagnostik bei Verdacht auf eine ANA-assoziierte rheumatische Erkrankung (AARE) wie systemischen Lupus erythematoses (SLE), systemische Sklerose (SSc), Sjögren-Syndrom (SjS), Mischkollagenose oder autoimmune Myositis (AIM) [1, 2]. Bei negativem ANA-Befund kann eine AARE mit Ausnahme der AIM relativ sicher ausgeschlossen werden. ANA sind jedoch nicht spezifisch für eine AARE, da sie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. autoimmunen Lebererkrankungen), nicht-autoimmunen Erkrankungen (z.B. Tumoren) und sogar gesunden Individuen (in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht) nachweisbar sind [3–5]. Für die Diagnostik entscheidend sind ANA-Titer und ANA-Muster sowie die zu Grunde liegende ANA-Spezifität, welche entsprechend der diagnostischen Fragestellung sowie dem vorliegenden ANA-Muster mittels spezifischer Immunoassays bestimmt wird [6, 7]. Die Klassifikation der ANA-Muster wird in den Routinelaboren unterschiedlich gehandhabt, meist werden jedoch granuläre (fein- oder grobgranuläre), homogene, nukleoläre und centromere Muster differenziert. Als „homogenes“ Muster werden im Allgemeinen alle Muster zusammengefasst, welche eine Chromatinfärbung der mitotischen Zellen anzeigen [8]. Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass das sogenannte homogene Muster in mindestens zwei Muster mit unterschiedlicher diagnostischer Relevanz differenziert werden sollte (Abbildung 1): in das klassische mit dsDNA-Antikörpern assoziierte homogene Muster sowie in das dicht-feingranuläre (DFS: „dense fine speckled“) mit DFS70-Antikörpern assoziierte Muster [9, 10].

Historie: DFS-Muster und ANA-Spezifität

Das relativ gut von anderen ANA abgrenzbare DFS-Muster ist charakterisiert durch unregelmäßig verteilte feingranuläre Fluoreszenz der Zellkerne der Interphase sowie des Metaphase-Chromatins (Abbildung 1). Obwohl es in

der Routinediagnostik häufig zu beobachten ist, wurde es erst 1994 als separates Muster eines mit interstitieller Zystitis assoziierten Autoantikörpers beschrieben [11]. Das nukleäre Zielantigen wurde entsprechend der Reaktivität des Autoantikörpers mit einem 70 kD-Protein im Westernblot als DFS70-Antigen bezeichnet [11, 12]. Analysen von Proteinsequenz-Datenbanken zeigten, dass das DFS70-Antigen identisch mit einem als Transkriptionskoaktivator p75 (Synonym: „lens epithelium-derived growth factor“, LEDGF) bezeichneten Protein ist [12]. Dieses Protein (LEDGF/p75) wurde von drei Forschergruppen unabhängig voneinander charakterisiert: als Transkriptionskoaktivator p75 [13] sowie als Wachstumsfaktor für Linsenepithelzellen [14, 15]. Die Bezeichnung LEDGF ist jedoch unzutreffend, da das DFS70-Antigen in den meisten Geweben vorkommt und keine direkte Bedeutung in der Entwicklung des Linsenepithels hat. LEDGF wurde ebenfalls als Autoantigen einer bereits 1997 als Sa-Antikörper beschriebenen ANA-Spezifität identifiziert [16]. Auch in Unkenntnis des ANA-Befundes wurden Autoantikörper gegen LEDGF durch serologisches Screening von rekombinanten cDNA-Bibliotheken gefunden [17, 18]. So wurden z.B. LEDGF-Antikörper als eine Reaktivität von Anti-Retina-Antikörpern bei Patienten mit atypischer Retina-Degeneration charakterisiert [18].

Neben einer Reihe von physiologischen Funktionen wie dem Zellschutz gegenüber Stress-induzierter Apoptose dient LEDGF/p75 als Kofaktor der HIV-Replikation durch Interaktion mit der viralen Integrase [19]. Die Rolle dieses Autoantigens im Rahmen der Induktion einer spezifischen Immunantwort ist jedoch noch ungeklärt. Obwohl die korrekte Bezeichnung des Proteins PSIP1 („PC4 and SFRS1 interacting protein 1“) lautet, ist LEDGF/p75 als Autoantigen für DFS70-Antikörper weiter gebräuchlich. Synonyme Bezeichnungen für DFS70-Antikörper sind daher LEDGF- oder LEDGF/p75-Antikörper. Mittels rekombinanter Proteine konnte das Epitop der DFS70-Antikörper lokalisiert werden. Das identifizierte Konformationsepitop befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins zwischen Aminosäure 349–435 [20].

Änderung des Anforderungsklientels

Historisch wurde der ANA-HEp-2-Test ausschließlich von Rheumatologen und Immunologen im Rahmen der AARE-Diagnostik angefordert. Jedoch erfuhr der ANA-Test über die Jahre eine zunehmende Beliebtheit und wird heute von vielen Klinikern aus verschiedenen Disziplinen angefordert. Zu diesen gehören Allgemeinmediziner, Hämatologen,

Abbildung 1 Differenzierung "homogener" ANA-Muster an HEp-2-Zellen (links: Übersicht; rechts: Metaphasezellen).

(A) dicht-feingranuläres Muster („dense fine speckled“) der Interphasekerne (1) sowie des Metaphase-Chromatins (2) eines DFS70-Antikörpers; (B) klassisches homogenes ANA-Muster eines dsDNA-Antikörpers mit homogen-peripherer Färbung der Interphasekerne (1) sowie des Chromatins in allen Mitosephasen (2,3); (C) „quasi-homogenes“ ANA-Muster mit homogen-feingranulärer Färbung der Interphasekerne sowie des Metaphase-Chromatins eines Autoantikörpers mit unbekannter Spezifität.

Nephrologen, Onkologen, Kardiologen, Gynäkologen, Neurologen und Gastroenterologen. Obwohl die klinische Wertigkeit für viele Fragestellungen umstritten oder

nicht eindeutig belegt ist, kann die Testung in einigen Fällen einen wichtigen Hinweis auf einen Autoimmunprozess liefern. Jedoch muss aufgrund der reduzierten

Pre-Testwahrscheinlichkeit mit einer stark verminderten Post-Testwahrscheinlichkeit für AARE gerechnet werden [1]. Eine exakte Musterdifferenzierung erlaubt Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden diagnostisch relevante ANA-Spezifitäten und erhöht damit die Wertigkeit eines breiten ANA-Screenings durch gezielte Auswahl nachfolgender spezifischer Immunoassays (z.B. Bestimmung von DFS70-Antikörpern bei Vorliegen des DFS-Musters).

Klinische Relevanz der DFS70-Antikörper

Die klinische Relevanz der DFS70-Antikörper ist trotz zahlreicher Studien weitestgehend ungeklärt. Frühe Untersuchungen zeigten eine Assoziation mit interstitieller Zystitis, atopischer Dermatitis und verschiedenen anderen inflammatorischen Erkrankungen sowie Prostata-Karzinom [11, 12, 17, 21, 22]. Jedoch wurde bisher keine dieser Assoziationen eindeutig belegt und in die Routinediagnostik überführt. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Studien zu DFS70-Antikörpern zusammengefasst. Aus den bisherigen Ergebnissen ist eine mögliche Assoziation mit Augenerkrankungen (Katarakt, atypische Retina-Degeneration, Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom) ableitbar, welche aber durch weitere Studien erhärtet werden müsste. Die Studien zeigen auch, dass die Prävalenz von DFS70-Antikörpern innerhalb einer bestimmten Krankheitskohorte (z.B. atopische Dermatitis) beträchtlich variieren kann. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und können zum einen in der Heterogenität hinsichtlich Epitopspezifität der Anti-DFS70-Reaktivitäten [2], zum anderen in unterschiedlichen Studien-Designs (Quelle und Präparation des Autoantigens, DFS70-Antikörper-Nachweismethode, Einschluss- und Ausschlusskriterien für bestimmte Krankheitsentitäten) liegen. Es ist nicht auszuschließen, dass verschiedene Populationen von DFS70-Antikörpern mit unterschiedlicher klinischer und pathogenetischer Relevanz existieren. So sind beispielsweise gegen Linsenepithelzellen zytotoxisch wirkende LEDGF-Antikörper in Seren von Patienten mit atopischer Dermatitis beschrieben worden, welche für die Kataraktentwicklung bei diesen Patienten bedeutsam sein könnten [23]. Die hohe Prävalenz von DFS70-Antikörpern bei ANA-positiven gesunden Personen spricht dafür, dass bei diesen wie auch bei einem Teil der ANA-positiven Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen (siehe Tabelle 1) die DFS70-Antikörper eher als Paraphänomen (z.B. als Reaktion auf verstärkte Stress-induzierte LEDGF-Expression) anzusehen sind.

DFS70-Antikörper bei klinisch gesunden Personen

Die mit unterschiedlichen Methoden ermittelten Prävalenzen bei gesunden Personen schwanken zwischen 0 und 22% (Tabelle 1), wobei die Ursachen im Wesentlichen im methodischen Bereich (Autoantigen, Assay-Konfiguration, Kalkulation des Grenzwerttiters) liegen [25]. Vergleichbare Studien zeigen eine Prävalenz zwischen 5 und 11% [10, 22–25]. Somit sind DFS70-Antikörper die am häufigsten nachweisbaren ANA-Spezifitäten bei gesunden Personen. In einem großen Kollektiv von medizinischem Personal wurden in 11% (64/597) DFS70-Antikörper mittels Kombination von HEp-2-Zell-Test (DFS-Muster) und Immunoblot mit rekombinantem LEDGF nachgewiesen [25]. Die DFS70-Antikörper waren ausschließlich vom IgG-Typ und repräsentierten 54% der ANA in dieser Population. Eine Befragung von 52 der DFS70-Antikörper positiven Personen lieferte keine Hinweise auf das Vorliegen einer AARE. Interessanterweise ist die Prävalenz der DFS70-Antikörper signifikant höher in der Gruppe der unter 35jährigen im Vergleich zu den über 35jährigen. Eine Altersabhängigkeit der DFS-Muster konnte auch im Rahmen einer Populationsstudie bei 918 gesunden Personen gezeigt werden [10]. Diese Population wurde nach anamnestischen Ausschluss von AARE, schweren Infektionen und Tumoren als AARE-Vergleichsgruppe eingesetzt. Mehr als 90% der ANA mit dem DFS-Muster wurden bei Personen jünger als 50 Jahre beobachtet. Eigene, mittels CIA ermittelte Befunde an 300 Blutspendern weisen ebenfalls auf eine Altersabhängigkeit der DFS70-Reaktivitäten hin. Während bei den unter 40jährigen in 7,3% DFS70-Antikörper nachweisbar waren, war dies nur in 3,4% der über 40jährigen der Fall. Die bei gesunden Individuen zu findenden DFS70-Antikörper zeigen fast ausnahmslos das typische DFS-Muster an HEp-2-Zellen [24, 25]. Interessanterweise sind die DFS-Muster in über 70% im mittel- bis hochtitrigen Bereich (ab 1:320) zu finden, während das am häufigsten bei gesunden Personen nachweisbare feingranuläre ANA-Muster vorwiegend im niedrigtitrigen Bereich (<1:320) gesehen wird [10].

DFS70-Antikörper in ANA-positiven Routine-Kohorten

Die Prävalenz des DFS-Musters im Rahmen des ANA-Screenings an HEp-2-Zellen liegt zwischen 0,8 und 1,6% [24, 28, 29]. In der Studie von Dellavance et al. [9] sind es methoden- und populationsbedingt sogar 16,5%. In über 90% der Fälle mit DFS-Muster konnten auch DFS70-Antikörper mittels Immunoblot, CIA oder ELISA

Tabelle 1 Ergebnisse von Studien zur Prävalenz von DFS70-Antikörpern bei Gesunden und Patienten mit autoimmunen und nicht-autoimmunen Erkrankungen.

Erkrankung	DFS70-Antikörper positiv (%)	Bestimmungsmethode	Literatur
Verschiedene inflammatorische Erkrankungen			
Alopecia areata	22/111 (20)	IIF, IB, EIA	[22]
Asthma	8/50 (16)	IIF, IB	[12]
	1/25 (4)	CIA	[24]
Atopische Dermatitis	19/64 (29,7)	IIF, IB	[12]
	15/21 (71,4)	EIA	[23]
	3/29 (10,3)	EIA, IB	[16]
	0/16 (0)	CIA	[24]
Atopische Dermatitis mit Katarakt	8/8 (100)	EIA	[23]
Atypische Retina-Degeneration	3/3 (100)	IB	[18]
Morbus Behçet	11/32 (34,4)	EIA	[17]
Hashimoto-Thyreoiditis	4/67 (6%)	CIA	[24]
Chronisches Müdigkeitssyndrom	2/60 (3,3)	IIF, IB	[12]
	90/226 (40)	EIA, IB	[16]
Interstitielle Zystitis	9/103 (8,7)	IIF, IB	[12]
	2/40 (5)	CIA	[24]
Psoriasis	1/22 (4,5)	IIF, IB	[12]
Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom	24/36 (66,7)	EIA	[15]
Sympathische Ophthalmie	5/7 (71,4)	EIA	[17]
Sarkoidose	4/16 (25)	EIA	[17]
Systemische Autoimmunerkrankungen			
Systemischer Lupus erythematoses	0/36 (0)	IIF, IB	[12]
	1/55 (2)	IIF, IB, EIA	[25]
	7/251 (2,8)	CIA	[24]
	7/124 (6)	IIF, IB	[26]
Systemische Sklerose	1/40 (25)	IIF, IB	[12]
	0/50 (0)	IIF, IB	[25]
	0/29 (0)	CIA	[24]
	1/164 (0,6)	IIF, IB	[26]
Sjögren-Syndrom	2/29 (6,9)	IIF, IB	[12]
	3/30 (6,7)	IIF, IB, EIA	[25]
	8/71 (11)	IIF, IB	[26]
Autoimmune Myositiden	0,25 (0)	IIF, IB, EIA	[25]
	7/116 (6,4)	EIA (MBL)	[27]
	4/80 (5)	IIF, IB	[26]
Mischkollagenosen	0/8 (0)	IIF, IB	[26]
Rheumatoide Arthritis	1/39 (2,6)	CIA	[26]
	0/13	IIF, IB	[26]
Tumoren			
Prostata-Karzinom	38/206 (18,4)	EIA	[21]
Verschiedene Tumoren	6/334 (1,6)	IIF	[28]
Kolon- und Mamma-Karzinom	0/40 (40)	CIA	[24]
Gesunde Personen			
	0/39 (0)	IIF, IB	[12]
	8/37 (21,6)	EIA	[17]
	64/597 (11)	IIF, IB, EIA	[25]
	35/650 (5,4)	EIA	[23]
	11/124 (8,9)	CIA	[24]
	8/105 (8)	IIF, IB, EIA	[22]

CIA, Chemolumineszenz-Immunoassay (QUANTA Flash® DFS70, Inova Diagnostics Inc., San Diego, USA); IB, Immunoblot; IIF, indirekte Immunfluoreszenz (HEp-2-Zell-Test); EIA, Enzymimmunoassay.

nachgewiesen werden [9, 24, 30]. Das klinische Spektrum bei DFS70-Antikörper positiven Patienten ist sehr heterogen und umfasst u.a. unspezifische rheumatische Symptome, Autoimmunerkrankungen, Infekte, Tumoren sowie atopische Erkrankungen [9]. Am häufigsten wurden Arthralgien (20%) und Hashimoto-Thyreoiditis (16%) diagnostiziert. Interessanterweise wurden die in früheren Studien mit DFS70-Antikörpern assoziierten Erkrankungen interstitielle Zystitis in nur einem Fall und atopische Dermatitis in 3 Fällen gefunden. AARE wurden bei 7/80 DFS70-Antikörper positiven Patienten (5 SLE, 2 SSc) diagnostiziert, wobei leider keine Angaben über AARE-assoziierte ANA-Spezifitäten vorlagen [9].

DFS70-Antikörper bei Patienten mit ANA-assoziiierter rheumatischer Erkrankung

Eine wachsende Anzahl von Studien in den letzten Jahren zeigte eine negative Assoziation der DFS70-Antikörper mit AARE, insbesondere wenn der Antikörper nicht in Begleitung von klinisch relevanten Autoantikörpern (z.B. Antikörper gegen dsDNA, Sm, U1-RNP, ribosomale P Proteine, DNA-Topoisomerase I, Zentromerproteine, Ro52, Ro60, La/SS-B, Ku, Mi2, Jo1) vorliegt. Beim Positivität eines isolierten DFS70-Antikörpers verringert sich die post-Test-wahrscheinlichkeit für eine AARE deutlich [30, 31].

Die Prävalenz von DFS70-Antikörpern in AARE-Patienten ist signifikant niedriger im Vergleich zur Prävalenz bei gesunden Personen [24, 25]. Besonders deutlich wird dies im Vergleich mit ANA-positiven gesunden Personen. In einer Metanalyse von 1075 AARE-Patienten umfassen den Studien [9, 24–27] ergab sich eine DFS70-Antikörper-Prävalenz von 3,8% (Tabelle 2). Analysiert man nur die DFS70-Antikörper, welche bei Abwesenheit von AARE-relevanten Autoantikörpern positiv gemessen wurden, liegt die Nachweisfrequenz bei nur 1%, bei SLE-Patienten sogar nur bei 0,4%. Da in den vorliegenden Studien noch nicht alle Myositis-spezifischen Antikörper bestimmt wurden (z.B. Mi-2, NXP-2, MDA5, TIF1y, HMGR, SAE, PL7, PL12), sollte der Anteil monospezifisch nachweisbarer DFS70-Antikörper bei Myositispatienten und damit auch in der AARE-Gesamtpopulation wesentlich unter 1% liegen [32]. Die Bedeutung der DFS70-Antikörper als Ausschlusskriterium einer AARE wird ebenfalls durch Verlaufsuntersuchungen DFS70-Antikörper positiver gesunder Personen bekräftigt, welche im Beobachtungszeitraum von 4 Jahren keine AARE entwickelten [10].

Die Ergebnisse bisheriger Studien zur klinischen Assoziation von DFS70-Antikörpern haben langfristig einen möglichen Einfluss auf die Klassifikationskriterien

Tabelle 2 Prävalenz von DFS70-Antikörpern bei ANA-assoziierten rheumatischen Erkrankungen (AARE).^a

Erkrankung	DFS70-Ak positiv	DFS70-Ak monospezifisch ^b positiv
SLE	15/466 (3,2%)	2/466 (0,4%)
Systemische Sklerose	2/283 (0,7%)	1/283 (0,35%)
Sjögren-Syndrom	13/130 (10%)	1/71 (1,4%)
Autoimmune Myositiden	11/196 (5,6%)	6/196 (3,1%)
AARE gesamt	41/1075 (3,8%)	10/1016 (1%)

^aZusammenfassung der Ergebnisse von fünf Studien [9, 24–27].

^bDFS70-Antikörper positiv bei Abwesenheit der für die entsprechende AARE diagnostisch relevanten Autoantikörper (Wertung nur bei eindeutigen Angaben).

für den SLE, die als ein Kriterium einen positiven ANA-Befund enthalten [33, 34]. Basierend auf der existierenden Datenlage wäre es sinnvoll, ANA mit DFS-Muster bei Nachweis von DFS70-Antikörpern als Kriterium auszuschließen. Die Testung von DFS70-Antikörpern hat auch mögliche gesundheitsökonomische Auswirkungen, da mit Hilfe dieser Antikörper unnötige Überweisungen und Folgeuntersuchung von asymptomatischen ANA positiven Patienten vermieden werden können.

Empfehlungen für die Routinediagnostik

DFS70-Antikörper-Nachweismethoden

Die Bestimmung von DFS70-Antikörpern kann mittels verschiedener Methoden durchgeführt werden. Diese umfassen ELISA, Immunoblot, Line- bzw. Dot-Immunoassays sowie einen CIA [24, 30, 33, 35]. Kommerziell erhältlich sind derzeit lediglich ein Enzymimmunoassay (DFS70/LEDGF ELISA Kit, MBL Medical & Biological Labs. Co., Ltd, Nagano, Japan) für Forschungszwecke sowie ein CIA (QUANTA Flash® DFS70, Inova Diagnostics, San Diego, USA) für diagnostische Zwecke. Eine weitere Möglichkeit der Detektion von DFS70-Antikörpern ist die IIF basierend auf HEp-2-Zellen nach Immunadsorption der DFS70-Antikörper (NOVA Lite® HEp-2 Select, Inova Diagnostics, San Diego, USA). Für dieses Verfahren wird ein Probenpuffer eingesetzt, der rekombinantes DFS70-Antigen enthält [36]. Auf diese Weise wird verhindert, dass DFS70-Antikörper an die in der HEp-2-Zelle vorliegenden DFS70-Bindungsstellen binden. Ein Vorteil dieser Methode besteht

darin, dass Mischmuster aus DFS und anderen Mustern (z.B. Zentromer-Muster) identifiziert werden können.

Wie bereits beschrieben, können die Ergebnisse bei Einsatz unterschiedlicher Assays zu differenten Ergebnissen führen [22, 25, 37], bedingt z.B. durch unterschiedliche Antigenquellen in Kombination mit differenter Feinspezifität [12, 17, 18, 38]. Dies zeigt sich vor allem in der Prävalenz von DFS70-Antikörpern bei atopischen Erkrankungen (Tabelle 1). Zur Bestätigung der klinischen Relevanz bei diesen Erkrankungen sowie bei verschiedenen Augenerkrankungen sind möglicherweise andere Assays erforderlich. Für die differentialdiagnostische Relevanz bzgl. des Ausschlusses einer AARE bei ANA-positiven Personen ist dies jedoch irrelevant. Die bei gesunden Personen und AARE nachweisbaren DFS70-Antikörper scheinen keine relevanten Epitopdifferenzen aufzuweisen [20]. Auch zeigte ein quantitativer Vergleich des DFS70 ELISA (MBL)

mit dem CIA (Inova) trotz Unterschiede im Antigen eine ausgezeichnete Korrelation dieser beiden Methoden [24].

ANA-Screening und DFS-Muster

Das feingranuläre und das DFS-Muster sind die häufigsten im Routine-Screening an HEp-2-Zellen nachweisbaren ANA-Muster. Während das feingranuläre Muster vorwiegend niedrigtitrig vorliegt, sind DFS-Antikörper unabhängig vom klinischen Hintergrund auch häufig in mittleren und höheren Titern zu finden [9, 10, 21, 29]. Die Angaben zur Assoziation dieses Musters mit den DFS70-Antikörpern schwanken zwischen 11% [39] bis über 90% [9, 20, 30]. In eigenen Untersuchungen konnten wir eine Prävalenz von mittels CIA nachweisbaren DFS70-Antikörpern in 37% bei DFS-Mustern ab einem Titer von 1:640 finden. Diese Unterschiede sind zum Teil zurückzuführen auf die

Abbildung 2 Empfohlener Testalgorithmus für die Routinediagnostik von ANA-assoziierten rheumatischen Erkrankungen (AARE) unter Einbeziehung von DFS-Muster und DFS70-Antikörpern (modifiziert nach [35]).

Aufgrund der negativen Assoziation der DFS70-Antikörper mit AARE sollten DFS-Muster von anderen ANA-Mustern (homogen, feingranulär, nukleolär, centromer) differenziert werden. Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgen in Abhängigkeit der IIF-Muster an HEp-2-Zellen (DFS-Muster, andere ANA-Muster, zytoplasmatische Muster) sowie der klinischen Fragestellung. Patienten mit negativen AARE-assoziierten Antikörpern und positivem DFS70-Antikörperbefund haben eine (sehr) geringe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen oder die Entwicklung einer AARE.

variable Nachweisbarkeit bei Einsatz unterschiedlicher HEp-2-Zell-Assays und auf Probleme in der Interpretation der DFS70-Muster [39]. So ist es durchaus sehr subjektiv, DFS-Muster in niedrigen Titern von DFS-ähnlichen, z.B. „quasi-homogenen“ Mustern (siehe Abbildung 1), zu differenzieren. Bei gleichzeitigem Vorliegen von AARE-assoziierten ANA-Spezifitäten (v.a. dsDNA-Antikörper) können die DFS-Muster maskiert sein oder übersehen werden. Am häufigsten bei AARE sind DFS70-Antikörper mit Ro/SS-A-Antikörpern assoziiert [29], was aber keinen Einfluss auf das DFS-Muster des Mitose-Chromatins hat. Daher sind DFS- bzw. DFS-ähnliche Muster häufiger beim Sjögren-Syndrom im Vergleich zu anderen AARE zu finden. Auch wurde eine Assoziation von Coilin- mit DFS70-Antikörpern gefunden [25, 40]. Die typischen Coilin-Dots in den Interphasekernen sind in diesen Fällen mit dem DFS-Muster kombiniert [40]. Zusammenfassend ist zu empfehlen, dass im Rahmen der ANA-Diagnostik alle dsDNA-Antikörper negativen Proben mit Chromatin-Färbung in der Immunfluoreszenz auf DFS70-Antikörper untersucht werden sollten.

Diagnostische Strategie

Trotz aller Fortschritte bei der Etablierung spezifischer Autoantikörperassays ist das ANA-Screening mittels IIF an HEp-2-Zellen für eine qualitätsgerechte Labordiagnostik von AARE weiterhin unabdingbar [1, 41, 42]. Mit den Erkenntnissen zur Relevanz von DFS-Mustern und DFS70-Antikörpern eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Optimierung der serologischen Stufendiagnostik bei Verdacht auf AARE. ANA werden zwar als zuverlässige Screening-Parameter für AARE angesehen und gelten sogar als Klassifikationskriterium für den SLE, können aber auch zu Fehldiagnosen und bei unklarer oder nicht passender klinischer Symptomatik zu unnötiger Besorgnis bei Arzt und Patient führen. DFS70-Antikörper sind daher wertvolle neue Biomarker zur besseren Interpretation positiver ANA bei Negativität für AARE-assoziierte Autoantikörper und sollten in modifizierte Testalgorithmen (Abbildung 2) zur Vermeidung unnötiger Überweisungen und Folgeuntersuchungen von ANA positiven Personen integriert werden.

Interessenkonflikt: Michael Mahler ist Mitarbeiter von Inova Diagnostik und Erfinder der NOVA Lite HEp-2 Methode, erhält jedoch keine Lizenzkompensation für das Produkt. Dieses hatte jedoch auf die Planung und das Verfassen des Artikels keinen Einfluss.

Literatur

1. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res* 2014;2014:315179.
2. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2010;1183:267–87.
3. Tan EM, Zhang J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol Rev* 2008;222:328–40.
4. Narciso-Schiavon JL, Freire FC, Suarez MM, Ferrari MV, Scandola GQ, Schiavon LD, et al. Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: clinically relevant or an epiphenomenon? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:440–6.
5. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601–11.
6. Conrad K, Schößler W, Hiepe F. Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Ein diagnostischer Leitfaden, 4. Auflage. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2012.
7. 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.
8. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowsky J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35:276–90.
9. Dellavance A, Viana VS, Leon EP, Bonfa ES, Andrade LE, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol* 2005;32:2144–9.
10. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63:191–200.
11. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol* 1994;151:587–92.
12. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1211–20.
13. Ge H, Si Y, Roeder RG. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* 1998;17:6723–9.
14. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:373–81.
15. Shinohara T, Singh DP, Fatma N. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:341–58.
16. Kuwabara N, Itoh Y, Igarashi T, Fukunaga Y. Autoantibodies to lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator P75 (LEDGF/P75) in children with chronic nonspecific complaints and with positive antinuclear antibodies. *Autoimmun* 2009;42:492–6.

17. Yamada K, Senju S, Shinohara T, Nakatsura T, Murata Y, Ishihara M, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett* 2001;78:161–8.
18. Chin MS, Caruso RC, Detrick B, Hooks JJ. Autoantibodies to p75/LEDGF, a cell survival factor, found in patients with atypical retinal degeneration. *J Autoimmun* 2006;27:17–27.
19. Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debyser Z, et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 2003;278:33528–39.
20. Ogawa Y, Sugiura K, Watanabe A, Kunitatsu M, Mishima M, Tomita Y, et al. Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain. *J Autoimmun* 2004;23:221–31.
21. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, Heeb MJ, et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 2005;62:14–26.
22. Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, Sugiura K, Shimomura Y, Aoki N, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun* 2004;23:257–66.
23. Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, Majima Y, Yata K, Ibaraki N, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmun* 2002;35:319–27.
24. Mahler M, Parker T, Peebles CL, Andrade LE, Swart A, Carbone Y, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012;39:2104–10.
25. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004;50:892–900.
26. Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus* 2008;17:171–6.
27. Muro Y, Sugiura K, Nakashima R, Mimori T, Akiyama M. Low prevalence of anti-DFS70/LEDGF antibodies in patients with dermatomyositis and other systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2013;40:92–3.
28. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, Alessio MG, Platzgummer S, Morozzi G, et al. Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann NY Acad Sci* 2007;1107:174–83.
29. Pazini AM, Fleck J, dos Santos RS, Beck ST. Clinical relevance and frequency of cytoplasmic and nuclear dense fine speckled patterns observed in ANA-HEp-2. *Bras J Rheumatol* 2010;50:655–64.
30. Miyara M, Albesa R, Charuel JL, El Amri M, Fritzler MJ, Ghillani-Dalbin P, et al. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:703759.
31. Fitch-Rogalsky C, Steber W, Mahler M, Lupton T, Martin L, Barr SG, et al. Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *PLoS One* 2014;e93812. DOI: 10.1371/journal.pone.0093812.
32. Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2014;13:367–71.
33. Petri M, Orbai AM, Alarcon 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.
34. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
35. 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;494356. DOI: 10.1155/2012/494356.
36. Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2012;11:642–45.
37. Mahler M, Raijmakers R, Fritzler MJ. Challenges and controversies in autoantibodies associated with systemic rheumatic diseases. *Curr Rheumatol Rev* 2007;3:67–78.
38. Xie C, Kim HJ, Haw JG, Kalbasi A, Gardner BK, Li G, et al. A novel multiplex assay combining autoantibodies plus PSA has potential implications for classification of prostate cancer from non-malignant cases. *J Translat Med* 2011, 9:43. Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/43>.
39. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. Recognizing the dense fine speckled/lens epithelium-derived growth factor/p75 pattern on HEp-2 cells: not an easy task! Comment on the article by Mariz et al. *Arthritis Rheum* 2011;63:4036–7.
40. Goto N, Sugiura K, Ogawa Y, Watanabe A, Onouchi H, Tomita Y, et al. Anti-p80 coilin autoantibodies react with a conserved epitope and are associated with anti-DFS70/LEDGF autoantibodies. *J Autoimmun* 2006;26:42–51.
41. 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.
42. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–2.