

## Autoantikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen<sup>1)</sup>

### Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells

Ulrich Sack<sup>1,\*</sup>, Karsten Conrad<sup>2</sup>, Elena Csernok<sup>3</sup>, Ingrid Frank<sup>4</sup>, Falk Hiepe<sup>5</sup>, Thorsten Krieger<sup>6</sup>, Arno Kromminga<sup>7</sup>, Philipp von Landenberg<sup>8</sup>, Gerald Messer<sup>9</sup>, Torsten Witte<sup>10</sup> und Rudolf Mierau<sup>11</sup> für die deutsche EASI-Gruppe (European Autoimmunity Standardization Initiative)

<sup>1</sup>Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

<sup>2</sup>Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Dresden, Deutschland

<sup>3</sup>Poliklinik für Rheumatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

<sup>4</sup>Labor Dr. Tiller, München, Deutschland

<sup>5</sup>Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité, Berlin, Deutschland

<sup>6</sup>Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Eppendorf der Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland

<sup>7</sup>Labor Lademannbogen, Hamburg, Deutschland

<sup>8</sup>Institut für Laboratoriumsmedizin, Universität Mainz, Mainz, Deutschland

<sup>9</sup>Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland

<sup>10</sup>Institut für Klinische Immunologie und Rheumatologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>11</sup>Labor an der Rheumaklinik Aachen, Aachen, Deutschland

<sup>1)</sup>Dieser Artikel ist ein Nachdruck der in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift erschienenen Originalpublikation Sack, U; Conrad, K; Csernok, E; Frank, I; Hiepe, F; Krieger, T; Kromminga, A; Landenberg, P von; Messer, G; Witte, T; Mierau, R; für die deutsche EASI-Gruppe (European Autoimmunity Standardization Initiative): Autoantikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz an Hep-2-Zellen. Dtsch Med Wochenschr 2009;134:1278–1282, mit freundlicher Genehmigung der DMW.

\*Korrespondenz: Prof. Dr. Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Medizinische Fakultät der Universität Leipzig Johannisallee 30, 04103 Leipzig, Deutschland  
Tel.: +341 9725500

Fax: +341 9739367

E-Mail: ulrich.sack@medizin.uni-leipzig.de

### Zusammenfassung

Der Nachweis von Autoantikörpern ist ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Patienten mit Autoimmunerkrankungen. In der Labordiagnostik der Kollagenosen und der autoimmunen Lebererkrankungen spielt die indirekte Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen im Rahmen einer Stufendiagnostik eine zentrale Rolle. Trotz hoher Qualität der Diagnostik können die Befunde zwischen verschiedenen Labors jedoch wegen fehlender Standardisierung und subjektiver Faktoren zum Teil erheblich differieren. Die vorliegende Arbeit formuliert Empfehlungen für eine vereinheitlichte Bearbeitung und Interpretation des HEp-2-Zell-Testes zum Nachweis von nicht organspezifischen (v.a. antinukleären) Antikörpern. Dabei werden Anforderungen an die verwendeten Diagnostika, Hinweise für die Abarbeitung und Auswertung im Labor und Empfehlungen für die Interpretation gegeben. Für eine optimale Labordiagnostik sind neben einer aussagefähigen klinischen Verdachtsdiagnose und einem erfahrenen Labordiagnostiker folgende Eckpunkte zu empfehlen: Initiales Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz an sorgfältig ausgewählten HEp2-Zellen, beginnend mit einer Serumverdünnung von 1:80 und Auswertung in einem lichtstarken Mikroskop, positive Befundung ab einem Titer von 1:160, laborinterne Qualitätssicherung und vereinheitlichte Befundung. Ziel ist die Verbesserung der Diagnostik und Betreuung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen als zentrales Anliegen der „European Autoimmunity Standardization Initiative“ (EASI).

**Schlüsselwörter:** antinukleäre Antikörper; Autoantikörper; Autoimmunerkrankungen; HEp-2-Zellen; Immunfluoreszenz; Methoden; Mikroskopie; Labordiagnostik; Standardisierung.

### Abstract

Systemic autoimmune diseases are characterized by the presence of antinuclear autoantibodies (ANAs). Diluted patient sera are typically used to screen for the presence of ANAs by immunofluorescence microscopy with fixed HEp-2 cells. Despite high quality test kits, reports of different

laboratories frequently present controversial results. This study presents a recommendation for a unified processing and interpretation of HEp-2 based screening for autoantibodies. We provide suggestions for selection of high quality test kits, optimized processing, and diagnostic procedures. For good laboratory practice, in addition to a relevant clinical diagnosis and an experienced laboratory specialist, the following procedure is highly recommended: initial HEp-2 based screening by indirect immunofluorescence, starting with a 1:80 serum dilution and evaluation in a bright fluorescence microscope, pathological values from a titer of 1:160, internal quality checks, and unified interpretation. We aim to improve diagnostics and care for patients with autoimmune diseases as a central focus of the European Autoimmunity Standardization Initiative (EASI).

**Keywords:** antinuclear antibodies; autoantibodies; autoimmune diseases; HEp-2 cells; immunofluorescence; laboratory diagnostics; methods; microscopy; standardization.

## Einleitung

Nicht organspezifische Autoantikörper (AAK) sind gegen hochkonservierte Antigene körpereigener Zellen gerichtet [1]. Diagnostisch relevante Zielstrukturen sind vor allem im Zellkern (antinukleäre Antikörper, ANA), aber auch im Zytoplasma lokalisiert. Das Screening auf diese AAK ist wesentlicher Bestandteil der Diagnostik von Kollagenosen und autoimmunen Lebererkrankungen. Der Nachweis erfolgt üblicherweise als Stufendiagnostik, wobei initial ein Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz-Testung (IIF) an HEp-2-Zellen, einer epithelialen Zelllinie aus einem humanen Larynxkarzinom, durchgeführt wird [2]. HEp-2-Zellen haben in der Rheumatologie als Substrat die anfänglich verwendeten Gefrierschnitte von Organen im Wesentlichen verdrängt, wobei aber in der Gastroenterologie die Diagnostik noch auf Gewebe durchgeführt wird, wie es in den Leitlinien insbesondere für die Autoimmunhepatitis festgeschrieben ist. Der wesentliche Vorteil der IIF an HEp-2-Zellen besteht darin, dass sie im Rahmen des Primärscreenings einen guten Überblick über die Mehrzahl der diagnostisch relevanten nicht organspezifischen AAK und deren Konzentration erlaubt.

Während anfänglich in immunologischen Labors eigene HEp-2-Zellen präpariert wurden und deren diagnostischer Einsatz auf Grund individueller Kultur- und Fixationsbedingungen mit einer großen Variabilität verbunden war, bieten Diagnostikahersteller inzwischen qualitativ akzeptable Präparationen auf unterschiedlich konfektionierten Objektträgern als in vitro-Diagnostika an [3]. Die Verwendung der Zellen in der IIF kann nicht durch den Einsatz lysierter HEp-2-Zellen im Enzymimmunoassay ersetzt werden, da nur die Immunfluoreszenz Informationen über alle diagnostisch relevanten AAK liefert.

Trotz der mittlerweile akzeptablen Qualität der verfügbaren HEp-2-Präparationen für die Immunfluoreszenz unterscheiden sich Befunde zwischen verschiedenen Labors zum Teil erheblich. In der vorliegenden Arbeit sollen daher

Empfehlungen zur Methodik der IIF sowie zur Interpretation von Immunfluoreszenzmustern auf HEp-2-Zellen gegeben werden, die zu einer besseren Vergleichbarkeit der Diagnostik beitragen und helfen sollen, Befunde unabhängig vom bearbeitenden Labor zu interpretieren. An der Erarbeitung waren klinisch und labormedizinisch tätige Wissenschaftler beteiligt, die innerhalb der deutschen Gruppe der „European Autoimmunity Standardization Initiative“ (EASI) bei der Verbesserung der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen kooperieren [4].

## Reagenzien und Testvorbereitung

### HEp-2-Zellen

HEp-2-Zellen werden von zahlreichen kommerziellen Anbietern als CE-zugelassenes Diagnostikum angeboten, können aber auch als Zelllinie für wissenschaftliche Fragestellungen von Zellbanken bezogen werden (z.B. American Tissue and Cell Collection CCL-23; <http://www.atcc.org>). Die Zellen erweisen sich bezüglich ihrer Morphologie, Antigenexpression und ihres Teilungsverhaltens als heterogen. Weiterhin gibt es modifizierte HEp-2-Zellen, bei denen die Expression bestimmter Antigene wie Ro (SS-A) durch Transfektion verstärkt ist. Wichtig für die Qualitätsbeurteilung der Zellen sind folgende Kriterien, die auf Herstellerseite durch Zellkulturbedingungen, Zellpräparation, Objektträgerherstellung, Fixierung und vorgegebenes Bearbeitungsprotokoll stark beeinflusst werden können:

- Zelldichte und Verteilung auf dem Objektträger
- Anzahl der Mitosen (mindestens 3 bis 5 Mitosen pro Blickfeld bei 200-facher Vergrößerung)
- Expression der Zielantigene für relevante Autoantikörper
- Erhalt der Morphologie
- Hintergrundfluoreszenz

Vor der Verwendung im Labor ist von jeder Charge die Qualität anhand definierter Kontrollen zu prüfen. Eine herstellerübergreifende Standardisierung in der Präparation der HEp2-Zellen und in der Konfektionierung von Testkits ist bislang nicht gegeben, obwohl dies Voraussetzung dafür wäre, bei der späteren Beurteilung sicherzustellen, dass nicht bereits auf Grund der Präparation Unterschiede bei den Titerstufen und den Fluoreszenzmustern entstehen. Zudem sind nur anhand standardisierter Vorgehensweisen eine Verlaufsbeurteilung und eine Vergleichbarkeit zwischen Laboratorien möglich. Für die Chargenkontrolle ist der Einsatz eines negativen Serums sowie von mindestens drei positiven Serumproben mit unterschiedlichen Fluoreszenzmustern auf Grund definierter Antikörperreaktivität (z.B. Zentromere, dsDNA, Ro/SS-A) erforderlich, die zudem alternierend mit jedem Testansatz mitgeführt werden müssen.

### Arbeitsplatz

Die Präparation der Ansätze für die IIF und die darauf folgende Auswertung am Fluoreszenzmikroskop sind typischerweise

räumlich getrennt. In Immunfluoreszenzlabors ist in besonders hohem Maße auf eine geringe Staubbelastung zu achten. Der Mikroskopraum muss ausreichend groß sein, um zwei Mitarbeitern gleichzeitiges Arbeiten zu ermöglichen, und eine adäquate Belüftung aufweisen. Insbesondere bei der Verwendung von Mikroskopen mit Quecksilberhochdrucklampen treten deutliche Wärmelasten auf. Ein Netzwerkanschluss für die Labor-EDV vereinfacht deutlich Arbeitsabläufe und Dokumentation.

## Testdurchführung

Anhand der Anforderung und der Probenbeschriftung müssen alle zu bearbeitenden Proben jederzeit sicher identifizierbar sein.

## Bearbeitung der Proben

Die Präanalytik ist beim Nachweis von Autoantikörpern eher unkritisch. Wegen möglicher Einflüsse auf das Testsystem sollten hämolytische, lipämische und ikterische Seren protokollarisch erfasst werden.

In der Regel sind die verwendeten Reagenzien mit einem CE-Zertifikat versehen, so dass die Analysen den Anweisungen des Herstellers entsprechend durchgeführt werden müssen. Abweichungen von Inkubationszeiten, Verdünnungen oder Puffersystemen können zu Veränderungen bei der Auswertung der Objektträger führen und müssen daher im Labor validiert werden. Die Bearbeitung erfolgt bei Raumtemperatur (20 bis 24°C).

Bei Verwendung von Objektträgern unterschiedlicher Hersteller muss sichergestellt sein, dass jeweils mit den dazugehörigen Testkomponenten gearbeitet wird. Insbesondere die Puffersysteme und die Konjugat-Konzentrationen sind in der Regel auf die entsprechenden Substrate auf den Objektträgern abgestimmt.

Zudem ist auf das Verfallsdatum und die korrekte Aufbewahrung der verwendeten Reagenzien zu achten. Insbesondere beim Konjugat ist sonst eine Intensitätsverminderung, die zu einem niedrigeren Titer des nachgewiesenen Autoantikörpers führen kann, zu erwarten.

Häufig sind die Volumina von Serum und Konjugat, die auf die entsprechenden Auftragsstellen pipettiert bzw. getropft werden sollen, nicht klar definiert. Die Objektträger haben oft je nach Hersteller unterschiedlich große Auftragsstellen. Hier muss sichergestellt werden, dass zum einen die gesamte Auftragsstelle mit Serum/Konjugat benetzt wird und es zum anderen nicht zu einem „Überlaufen“ aus einer Auftragsstelle kommt, da hier unmittelbar Kontaminationsgefahr für die nächste Auftragsstelle besteht. Empfehlenswert ist es, für jeden Objektträger die optimalen Volumina zu eruiieren und in die entsprechenden laborinternen Arbeitsanweisungen („Standard Operating Procedures“, SOPs) mit aufzunehmen.

Die einzelnen Inkubationsschritte sollten in einer feuchten Kammer durchgeführt werden, um ein Austrocknen und damit eine signifikante Verringerung des Probenvolumens pro Auftragsstelle zu verhindern. Dabei werden einfach zu

reinigende flache Kunststoffboxen eingesetzt, deren Boden mit einem einfach zu benetzenden und regelmäßig zu erneuernden porösen Träger, zum Beispiel Zellstoff bedeckt ist. Die Objektträger selbst dürfen nicht unmittelbar auf diesem aufliegen.

Die eigentliche Testdurchführung beginnt mit der Zugabe der in den mitgelieferten Puffern (meist phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung; PBS) verdünnten Seren auf die HEp-2-Zellmonolayer. Seren dürfen keinesfalls auf Nachbarfelder überlaufen. Die Inkubationszeit beträgt meist 30 Minuten, gefolgt von üblicherweise dreimaligem zehninütigen Waschen in PBS. Bei Verwendung von Küvetten verkürzt sich die Waschzeit auf 3×2 bis 5 Minuten. Die Eignung von Waschautomaten muss im Einzelfall überprüft werden; oft kommt es hier zu unbefriedigenden Ergebnissen durch erhöhte Hintergrundfärbung oder Ablösen von Zellen.

Beim Waschen der einzelnen Objektträger ist es wichtig, zunächst die einzelnen Auftragsstellen durch kurzes Abspülen mit Waschlösung vom Serum bzw. Konjugat zu befreien, bevor sie in die Küvette mit Waschlösung gestellt werden. Dieses Vorgehen soll verhindern, dass hochtitrige und hoch-avide Antikörper – auch bei nur kurzen Inkubationen – auf anderen Auftragsstellen zu einer Kreuzkontamination führen und die Ergebnisse verfälschen.

Nach Zugabe des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (Konjugat) und meist 30-minütiger Inkubation wird erneut gewaschen. Die Verwendung von FITC-markierten Sekundärantikörpern gegen humanes IgG ist sehr verbreitet und aus unserer Sicht optimal. Der Wert einer zusätzlichen Verwendung von Sekundärantikörpern gegen andere Immunglobulinklassen bedarf weiterer Untersuchungen. Häufig werden die FITC-markierten Sekundärantikörper zur besseren Unterscheidung des Fluoreszenzsignals mit 0,01 g/L Evans Blue versetzt.

Zum Abschluss der Testdurchführung werden die Objektträger mit einem glyzerinhaltigen Eindeckmedium eingedeckt (ca 80% Glycerin in PBS); darin enthalten ist in der Regel eine Anti-bleaching-Substanz. Hier sollte die optimale Menge des Eindeckmediums pro Objektträger laborspezifisch festgelegt werden. Ein massiver Überschuss an Eindeckmedium kann zu „Nebel“ und „Unschärfe“ bei der mikroskopischen Beurteilung führen. Zu berücksichtigen sind hierbei herstellerspezifische Unterschiede des Eindeckmediums.

Das in einigen Labors etablierte Verfahren des Säuberns bzw. Trocknens der Stellen um die Auftragsstellen mit einem Papier oder Tupfer ist unnötig und verursacht Fehler durch „Hineinwischen“ in die Zellen und das Einbringen von Staub und Fasern. Ein „sanftes“ Abklopfen der Objektträger und das Trocknen auf einer saugfähigen Unterlage sind ausreichend.

Die ausgewerteten Präparate können noch bis zu 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und analysiert werden. Im weiteren Verlauf wird jedoch durch Diffusion der Antikörper und Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe eine Re-Analyse erschwert, insbesondere beim Vorliegen von schwachen Reaktivitäten. Daher sollte ein Präparat luftdicht

eingeschweißt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden, falls eine Analyse zu Kontroll- oder Vergleichszwecken später noch einmal durchgeführt werden muss.

### Serumverdünnung

Für das Screening auf Autoantikörper wird eine Serumverdünnung von 1:80 eingesetzt. Die Mehrzahl der Testkits ist so eingestellt, dass dabei 95% der Seren von gesunden Kontrollpersonen keine Färbung zeigen, Seren mit diagnostisch relevanten Autoantikörpern jedoch erkannt werden. Selbst zusammengestellte Reagenzien (Test in Eigenherstellung) müssen im Rahmen der Validierung so eingestellt werden, dass bei dieser Verdünnung negative Seren von gesunden Blutspendern nicht erfasst werden. Die vom Hersteller im Rahmen der Chargenkontrolle erfolgte Einstellung muss in jedem Fall im Labor verifiziert werden. Gegebenenfalls ist zu überprüfen, ob Veränderungen in der Testdurchführung erforderlich sind, die allerdings validiert werden müssen. Hier sollte von den Herstellern eine Anpassung an das Konsensprotokoll angeboten werden.

Im positiven Fall erfolgt eine Wiederholung des Tests mit Ansatz einer geometrischen Verdünnungsreihe nach Stärke der primären Fluoreszenz (1:160; 1:320 bis 1:5120). Bei korrekter Testdurchführung und -auswertung gilt ein Titer ab 1:160 als diagnostisch relevant [5]. Ein Titer von 1:80 kann als grenzwertig angesehen werden, da in der Mehrzahl der Fälle bei diesem Titer keine diagnostisch relevanten ANA-Spezifitäten nachweisbar sind (siehe Tabelle 1).

### Kontrollen

Bei allen Untersuchungen müssen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt werden. Weiterhin sollten in regelmäßigen Abständen für wichtige Muster (siehe Abbildung 1) Seren eingesetzt werden, die krankheitstypische AAK enthalten. Dafür sind kommerzielle Kontrollseren verfügbar, es ist aber auch ein Einsatz von eigenen definierten positiven Proben möglich. Optimal ist der Einsatz von definierten Kontrollseren kommerzieller Anbieter, des „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) oder der „GFID“ (<http://www.gfid-ev.de>). Die vierteljährliche RiLiBÄK- und normenkonforme Teilnahme an Ringversuchen unabhängiger Anbieter (<http://www.ukneqas.org.uk>) wird dringend empfohlen.

### Mikroskopie

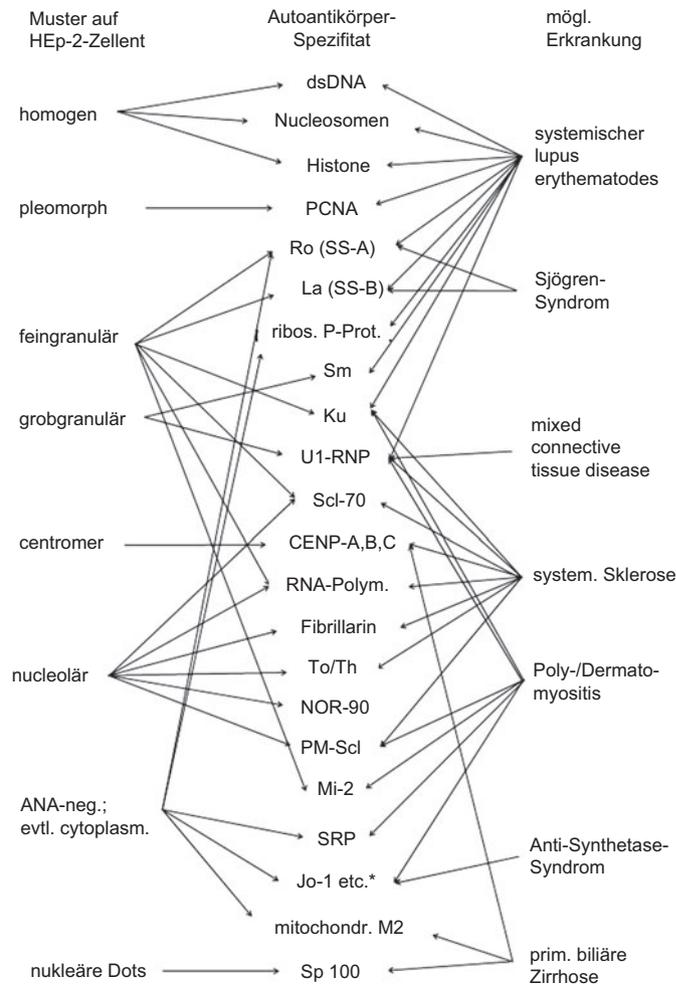
Eine exakte Musterbewertung erfolgt bei einer 400-fachen Vergrößerung (Kombination aus 10er Okular und 40er Objektiv). Zuerst wird die Intensität der Fluoreszenz beurteilt. Ferner müssen mehrere Mitosen in die Beurteilung einbezogen werden, so dass neben der klaren Entscheidung über das Vorliegen einer positiven oder negativen Fluoreszenz auch eine Aussage über das Grundmuster gemacht werden kann (Tabelle 1).

Die Lichtstärke sollte die einer 50 Watt Quecksilber-Dampflampe nicht unterschreiten. Zunehmend finden heute Dioden als Lichtquelle Anwendung, die insbesondere durch ihre konstante Helligkeit und hohe Lebensdauer (über 10.000

**Tabelle 1** Typische nukleäre und zytoplasmatische Fluoreszenzmuster für diagnostisch relevante Autoantikörper.

Grundmuster	Fluoreszenz auf HEp-2-Zelle	Mögliche Antigene
ANA-Muster		
homogen	homogene oder feingranuläre Kernfluoreszenz und Chromatin in Metaphase positiv (homogen)	dsDNA, Nukleosomen, Histone
feingranulär	(homogene bis) fein- bis mittelgranuläre Kernfluoreszenz, Chromatin in Metaphase negativ	Ro/SS-A, La/SS-B, Ku, Mi-2
grobgranulär (synonym: grobgesprenkelt)	grobgranuläre Kernfluoreszenz mit zahlreichen Verdichtungen, Nukleoli ausgespart	U1-RNP, Sm
nukleolär	nukleoläre Fluoreszenz	Scl-70 (mit Chromosomen-assoziation); PM-Scl, Fibrillarin, Th/To
zentromer	Dots entsprechend der Anzahl der Chromosomen in Interphasekern UND Mitosechromatin	CENP-B
nukleäre Dots	multiple nukleäre Dots (meist 13 bis 25 pro Kern); Chromatin in Metaphase negativ	Sp100
pleomorph	heterogene Färbung der Interphasenkerne	PCNA
Zytoplasmatische Muster		
homogen	Zytoplasma homogen bis feingranulär	Rib-P (wenn gleichzeitig Nukleoli positiv)
granulär	Zytoplasma fein- bis mittelgranulär (bzw. granuläre Dots)	Jo-1
mitochondrial	Feingestrichelte zytoplasmatische Fluoreszenz	AMA-M2
zytoskeletal	zytoskelettassoziierte Fluoreszenz	Aktin

Die Einteilung der Grundmuster erfordert die kombinierte Analyse von Interphasekernen und Metaphasechromatin. Nach Qualifikation und Erfahrung können weitere Muster erkannt werden (z.B. Golgi-Apparat, Zentrosom/Zentriol, Mitosespindel, CENP-F, Midbody). Auch derartige seltene Befunde sollten als potentiell krankheitsrelevant dokumentiert werden [6]. Sie sollten in Abhängigkeit vom Einsender ggf. weiter differenziert werden.



\*) weitere „Anti-synthetasen“: PI-7 PI-12, EJ, OJ, KS, Zo

**Abbildung 1** Zuordnung der in Tabelle 1 aufgeführten Immunfluoreszenzmuster auf HEp-2-Zellen zu häufig diesen Mustern zugrunde liegenden sowie zu hiermit (mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität) assoziierten entzündlichen Systemerkrankungen. Die Verbindungslinien deuten an, dass bei Vorliegen der in der rechten Spalte aufgeführten Verdachtsdiagnosen und/oder der in der linken Spalte aufgeführten Fluoreszenzmuster vorrangig nach den hiermit verbundenen Autoantikörpern gesucht werden sollte.

Betriebsstunden) eine echte Alternative zu den Quecksilberdampflampen (typenabhängig 100 bis 300 Betriebsstunden, Notwendigkeit der Justierung bei Lampenwechsel) darstellen.

Für eine Standardisierung der Fluoreszenzintensität besteht bislang noch keine technisch ausgereifte Lösung. Ansätze wie der Einsatz definierter Graufilter, standardisierter fluoreszierender Beads [7] oder von computergestützten Bildanalyseprogrammen [8–10] werden derzeit evaluiert.

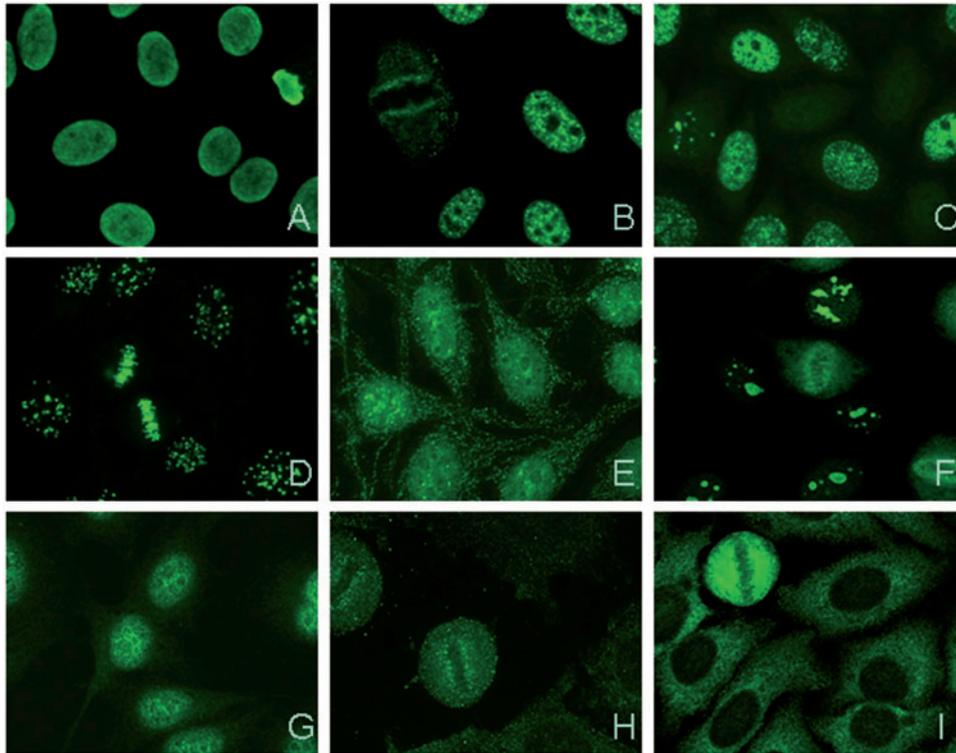
## Auswertung und Interpretation

Die HEp-2-Zelle weist ein breites Spektrum an darstellbaren Autoantigenen auf. Bei der Bewertung der Muster wird zuerst auf nukleäre, weiterhin aber auch auf zytoplasmatische Muster geachtet. Mischmuster sind häufig; im Befund müssen dann

die einzelnen Muster, ggfs. unter Angabe unterschiedlicher Titer, angegeben werden.

Bestimmte Färbemuster in der IIF weisen auf krankheitsrelevante AAK-Spezifitäten hin und indizieren den Einsatz von spezifischen Immunoassays (Abbildung 1). Im Zuge einer sinnvollen Stufendiagnostik ist es daher notwendig, die einem bestimmten Muster typischerweise zu Grunde liegenden Autoantikörper zu bestimmen. Bei nicht näher charakterisierbarem Fluoreszenzmuster unbekannter klinischer Relevanz ist es sinnvoll, dieses Muster zumindest als Bemerkung dem Kliniker mitzuteilen, um nachfolgenden Untersuchern eine Wiedererkennung zu ermöglichen.

Antinukleäre Antikörper werden in wenige Grundmuster unterteilt. Häufig liegen diese Muster auch als Mischmuster vor. Diese lassen sich durch Betrachtung verschiedener Verdünnungsstufen differenzieren, da z.B. homogene Fluoreszenzen bei niedriger Serumverdünnung andere Muster



**Abbildung 2** Typische Fluoreszenzmuster an HEp-2-Zellen.

(A) Homogenes Muster: Homogene Fluoreszenz der Interphasekerne sowie des Chromatins der mitotischen Zellen (dsDNA-Antikörper einer SLE-Patientin). (B) Grobgranuläres nukleäres Muster: grobgranuläre Fluoreszenz der Interphasekerne bei Aussparung der Nukleoli; Chromatin der mitotischen Zellen negativ (U1-RNP-Antikörper eines MCTD-Patienten). (C) Pleomorphes Muster: pleomorphe nukleäre Fluoreszenz am Beispiel eines PCNA-Antikörpers (Zellkerne negativ in der G1-Phase, schwach granulär positiv in der frühen S-Phase, granulär positiv bei Aussparung der Nukleoli in der mittleren S-Phase und granulär positiv mit Prominenz der Nukleoli in der späten S-Phase). (D) Centromeres Muster: Dots entsprechend der Anzahl der Chromosomen in den Interphasekernen sowie im Chromatin der mitotischen Zellen (Anti-Centromer-Antikörper einer Patientin mit systemischer Sklerose). € Nukleäres Dot-Muster: In Größe und Anzahl (bis zu 20 bei Sp100-Antikörpern) variierende nukleäre Dots; Chromatin der Mitosezellen negativ (Sp100-Antikörper eines Patienten mit PBC). (F) Nukleoläres Muster: Fluoreszenz der Nukleoli (Kernkörperchen) der Interphasezellen (antinukleoläre Antikörper einer Patientin mit systemischer Sklerose). (G) Feingranuläres nukleäres Muster: feingranuläre Fluoreszenz der Interphasekerne; Chromatin der Mitosezellen negativ (Ro/SSA-Antikörper eines Patienten mit Sjögren-Syndrom). (H) Feingranuläres zytoplasmatisches Muster: über das gesamte Zytoplasma verteilte feingranuläre Fluoreszenz (Jo1-Antikörper eines Patienten mit Polymyositis). (I) Homogen-feingranuläres zytoplasmatisches Muster: um den Zellkern verdichtete homogen-feingranuläre zytoplasmatische Fluoreszenz (SRP-Antikörper eines Patienten mit Polymyositis).

überstrahlen und damit maskieren können. Entsprechend der Verdachtsdiagnose ist es sinnvoll, auf die in Abbildung 2 dargestellten Fluoreszenzmuster gezielt zu achten. Die Beurteilung muss durch erfahrene Mitarbeiter/innen erfolgen, die sich regelmäßig auf autoimmundiagnostischem Gebiet weiterbilden. Zunehmend gibt es Ansätze, computergestützte Interpretationshilfen einzusetzen; erste Erfahrungen hierzu wurden kürzlich publiziert [6, 8].

## Interessenkonflikt

Abhängig von der diagnostischen Fragestellung und erforderlichen differentialdiagnostischen Feincharakterisierung sollte sich an das Screening eine Folgediagnostik auf Basis spezifischer Immunoassays (Radio-, Enzym-, Dot/Line-Immunoassay) unter Einsatz hochgereinigter (natürlicher oder rekombinanter) Autoantigene anschließen.

Die Befundung muss neben der Beschreibung der gefundenen Fluoreszenzmuster und ihrer Titer die möglichen Zielantigene und vor allem die Wertung des Befundes im Licht der diagnostischen Fragestellung beinhalten. Letzteres gilt insbesondere auch für negative Befunde. Da im höheren Lebensalter niedrigtitrige Autoantikörper oft keinen Krankheitswert aufweisen, kann hier bei fehlender Klinik auf die Empfehlung zur Differenzierung verzichtet werden. Die Erstellung eines Befundes mit dem Kommentar „ANA positiv“ ohne Angabe des Musters reicht nicht aus.

## Literatur

1. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 1957;2:732–4.
2. Hahn N, Eckert HL, Stewart J. Evaluation of cellular substrates for antinuclear antibody determinations. *J Clin Microbiol* 1975;2:42–5.

3. Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 331/1, 7.12.98 DE.
4. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Haas M, Krieger T, et al. Standardization of Autoimmune Diagnostics in Germany: Activities of the German Group in the European Autoimmune Standardization Initiative. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:31–6.
5. Kang I, Siperstein R, Quan T, Breitenstein ML. Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and –dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol* 2004;23:509–15.
6. Hiemann R, Conrad K, Roggenbuck D, Großmann K, Michel J, Anderer U, et al. Die HEp-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik – Automatisierung und Standardisierung. In: Conrad K, Lehmann W, Sack U, Schedler U, editors. *Multiparameteranalytik – Methoden, Applikationen, Perspektiven*. Lengerich: Pabst Science Publishers, Lengerich, 2008:98–117.
7. Kahn E, Vejux A, Ménétrier F, Maiza C, Hammann A, Sequeira-Le Grand A, et al. Analysis of CD36 expression on human monocytic cells and atherosclerotic tissue sections with quantum dots: investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28:14–26.
8. Hiemann R, Hilger N, Weigert M, Sack U, Michel J, Andere U. Image based description of immunofluorescence on HEp-2 cells. *Cytometry Part A* 2007;71A:60.
9. Sack U, Knoechner S, Warschkau H, Pigla U, Emmrich F, Kamprad M. Computer-assisted classification of HEp-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. *Autoimmun Rev* 2003;2:298–304.
10. Soda P. Early Experiences in the Staining Pattern Classification of HEp-2 Slides. *Proceedings of the Twentieth IEEE International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS'07)*, 2007.