

Bezeichnung:**ANA-IFT, Antinukleäre-(Auto)-Antikörper-Immunfluoreszenz -Test****Synonym:**

Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf anti-nukleäre Autoantikörper

Handelsname:

IIFT-Mosaik: HEp-2/Leber (Affe)

LOINC:

5048-4

Pathophysiologie:

Die indirekte Immunfluoreszenz auf anti-nukleäre Autoantikörper (ANA) mit fixierten humanen Epithelzellen (HEp-2 Zellen) ist der Goldstandard für die Bestimmung von Autoantikörpern, welche gegen nukleäre und auch zytoplasmatische Strukturen gerichtet sind.

Die Bestimmung von ANA ist für ANA-assoziierte entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen und hier insbesondere für die Krankheitsgruppe der Kollagenosen wichtig. Hierzu gehören beispielsweise der systemische Lupus erythematodes (SLE) oder die systemische Sklerodermie. Aber auch für verschiedene organspezifische Autoimmunerkrankungen - vorrangig die autoimmunen Lebererkrankungen - ist ihre Bestimmung wertvoll.

Die Erstbeschreibung der Methode erfolgte bereits 1950 durch A. H. Coons und M. H. Kaplan von der Harvard Medical School in Boston [Coons AH *et al.* 1950]. Dabei erfolgte der ursprüngliche Nachweis von Autoantikörpern (AAK) durch tierische Gewebeschnitte. Die Fluoreszenzmuster beschränkten sich hierbei auf den Zellkern, daher die Namensgebung anti-nukleäre AAK oder kurz ANA.

Mit Einführung von Substrat aus Zellen, welches alle Phasen des Zellzyklus beinhaltet, können heute auch zytoplasmatische Muster sowie Strukturen des mitotischen Zellzyklus nachgewiesen werden.

Der eigentlich treffendere Begriff für diese Bestimmung wäre heutzutage eher der indirekte Immunfluoreszenztest auf anti-zelluläre AAK, um das weitere Spektrum zu verdeutlichen. Der Begriff ANA bleibt jedoch aufgrund der weltweiten Etablierung und dem universellen Gebrauch mit existierenden Guidelines und bestehenden Klassifikationskriterien erhalten.

Da die verwendeten HEp-2 Zellen hunderte von zellulären Strukturen - sogenannte Antigene - beinhalten, welche als Bindungsstellen für diverse AAK dienen, können mit dieser Methode viele verschiedene AAK nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzmuster kann dabei einen ersten Hinweis auf die entsprechenden AAK liefern. Der spezifische Nachweis erfolgt in Anschlussuntersuchungen mittels aufgereinigten, definierten Einzelantigenen (z.B. Immunoblot, ELISA).

Da es aktuell noch nicht für alle relevanten AAK diesen spezifischen Nachweis gibt, gilt der ANA-IFT nach wie vor als **Eingangsuntersuchung und Hauptdiagnostik von ANA-assoziierten entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen**. Somit besteht der große Vorteil dieses Tests in der Vielfalt der repräsentierten Antigene. Der Test besitzt eine sehr hohe Sensitivität.

Nachteilig ist jedoch die geringe Spezifität. Nicht jeder AAK ist pathogenetisch wirksam und nicht jeder AAK muss zwangsläufig eine bestimmte autoimmunologische Erkrankung auslösen. Im Rahmen von Infekten kann es zum Auftreten einer polyklonalen B-Zell-Stimulation kommen, in deren Folge positive Reaktivitäten auftreten können. Auch Tumorerkrankungen oder Medikamente können den Titer ohne Vorliegen einer systemischen Autoimmunerkrankung erhöhen.

Allgemein werden Titer > 1:80 als positiv und Titer > 1:320 als deutlich positiv gewertet. Relativiert wird diese Einschätzung durch das Patientenalter. ANA liegen ab einem Alter von

etwa 50 Jahren häufiger mit einer Titerhöhe von bis zu 1:320 ohne jeden Krankheitswert vor. Bei Kindern sollten hingegen bereits geringere Titer als pathologisch interpretiert werden. Jedoch können ANA in jedem Alter unklar erhöht vorliegen. In einigen Studien wurden bei bis zu 12 - 25% anscheinend gesunder Individuen positive ANA-IFT-Resultate vorgefunden.

Da jedoch AAK auch Jahre vor Entstehung einer systemischen Autoimmunerkrankung detektiert werden können, sollte insbesondere bei zusätzlich spezifischem Nachweis krankheitsrelevanter AAK (z.B. AAK gegen Scl-70 oder Mitochondrien) unbedingt ein Monitoring des klinischen und serologischen Verlaufes, je nach erwarteter Krankheitsentwicklung in halb-zweijährlichen Intervallen erfolgen. Höhere Titer (> 1:320) weisen dabei eher auf eine relevante Erkrankung hin als niedrigere Titer.

Im Jahr 2013 veröffentlichte das American College of Rheumatology Empfehlungen zur ANA-Diagnostik; [Yazdany J *et al.* 2013]:

„Do not screen for ANAs in patients with non-specific symptoms, such as fatigue or myalgia, or in patients with fibromyalgia“.

Die Vorhersagekraft eines Tests hängt vor allem auch von der Häufigkeit einer Erkrankung ab. ANA-assoziierte entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen sind in der Gesamtbevölkerung selten.

Werden viele asymptomatische Personen auf ANA getestet, ist die Vortest-Wahrscheinlichkeit einer systemischen Autoimmunerkrankung so gering, dass die Wahrscheinlichkeit ein falsch positives Ergebnis zu erhalten die Wahrscheinlichkeit bei weitem übersteigt, dass tatsächlich ein richtig positives Ergebnis vorliegt.

Somit hängt die Aussagekraft dieses Testes in erster Linie von der richtigen Patientenauswahl ab!

Prophylaktische ANA-Testungen bringen keinen Vorteil und führen meist nur zu Unsicherheit und unklaren Diagnosen.

Von zwei Expertengruppen wurden im Jahr 2013 internationale Empfehlungen für die ANA-Diagnostik erarbeitet. Expertengruppen waren die "European autoimmunity standardization initiative", repräsentiert von 15 europäischen Ländern sowie die "International Union of Immunologic Societies/World Health Organization/Arthritis Foundation/Centers for Disease Control and Prevention autoantibody standardising comitee"; [Agmon-Levi N *et al.* 2014].

Es sollte beachtet werden:

1. Der ANA-IFT ist der Goldstandard und sollte die Eingangsuntersuchung bei der Diagnostik von entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen darstellen.

2. Der ANA-IFT sollte in erster Linie für die Diagnostik und nicht als Verlaufsuntersuchung verwendet werden, da die Höhe des Titers nicht unbedingt mit der Krankheitsaktivität korreliert.

3. Im Falle eines positiven ANA-IFT sollten Anschlussuntersuchungen mittels Bestimmung spezifischer Autoantikörper (z.B. Immunoblot, ELISA) erfolgen.

4. Bei sehr **hohem klinischem Verdacht** auf eine entzündlich-rheumatische Systemerkrankung sind **trotz negativem ANA-IFT Anschlussuntersuchungen mittels spezifischer Autoantikörper absolut indiziert**. Insbesondere AAK gegen Myositis-spezifische Antigene (z.B. Jo-1) sowie AAK gegen Antigene bei systemischem Lupus erythematodes/Sjögren-Syndrom (PCNA, ribosomales P-Protein, SS-A/Ro) können im ANA-IFT negativ sein.

Im Umkehrschluss muss bei **negativem ANA-IFT und fehlender Klinik** für entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen **nicht zwangsläufig eine Anschlussdiagnostik**

erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit bei dieser Konstellation richtig positive AAK zu finden ist niedrig und verursacht in der Regel nur zusätzliche Kosten.

Im Jahr 2014 wurde eine internationale Expertengruppe mit dem Ziel gegründet, weltweit eine einheitliche Beschreibung der verschiedenen Fluoreszenzmuster - welche mit indirekter Immunfluoreszenz auf HEp2-Zellen erkannt werden können - auszuarbeiten. Der „International Consensus on ANA Patterns“ (ICAP) erarbeitete bis zum Jahr 2018 eine Nomenklatur mit 30 international anerkannten Musterbezeichnungen (inklusive negativem Muster). Jedes Muster wird zusätzlich mit einer AC (anticellular) - Nummer versehen. Im Rahmen von ICAP wurde eine eigene Webseite mit Zusatzinformationen geschaffen (www.anapatterns.org).

Eine Übersicht über die neuen Muster mit Angabe der vorherigen Musterbezeichnung sowie der klinischen Bedeutung mit möglichen Zielantigenen und empfohlenen Folgeuntersuchungen finden sich auf der Homepage der ZE Klinische Chemie unter „Berechnungen und Interpretationen“ mit Titel „[Nomenklatur der ANA-Muster nach ICAP](#)“.

Indikation:

- Verdacht auf ANA-assoziierte entzündlich-rheumatische Systemerkrankung (insbesondere systemischer Lupus erythematodes (SLE), systemische Sklerodermie (Ssc), Sjögren-Syndrom (SjS), Sharp-Syndrom (MCTD), Poly-/Dermatomyositis (PM/DM), unklare Arthritiden)
- Verdacht auf autoimmune Lebererkrankungen (Autoimmunhepatitis, primär biliäre Cholangitis)

Präanalytik:

Probentransport und Abnahme:

Siehe hierzu die [Informationen](#) auf der Homepage der Zentralen Einrichtung Klinische Chemie.

Einflussfaktoren:

Patientenalter

Störfaktoren:

Hämolyse, Lipämie und Ikterus zeigten keinen Einfluss auf das Analyseergebnis

Einheit:

Titerstufen

Grundverdünnung: 1:80

Positive Proben werden in definierten Verdünnungsstufen wie folgt austitriert: 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120

Umrechnung:

-

Probenmaterial:

Im Serum, entnommen mit Standard-Probenentnahmeröhrchen (7,5ml Gelmonovette):



Referenzbereiche:

Erwartete Ergebnisse: ANA-Titer \leq 1:80 (negativ)

Methode/Messverfahren/Gerät:

Der Nachweis von ANA erfolgt als indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) gewöhnlich auf Objektträgern mit kultivierten humanen Epithelzellen (HEp-2-Zellen) und Primatenleber.

Der Suchtest dient ausschließlich der *in vitro* - Bestimmung humaner Antikörper in menschlichem Serum oder Plasma. Die Bestimmung kann qualitativ oder semiquantitativ erfolgen.

Substrat-Kombinationen aus HEp-2-Zellen und Primatenleber werden mit verdünnten Patientenproben inkubiert. Bei positiven Reaktionen binden sich Antikörper unterschiedlicher Klassen spezifisch an ihre intrazellulären Zielstrukturen/Antigene. Gebundene Antikörper werden in einem zweiten Inkubationsschritt mit Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgG (Ziege) angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Somit werden in diesem Test nur AAK der Immunglobulinklasse IgG erfasst.

Die Untersuchung erfolgt auf Biochips der Firma Euroimmun mit Reagenzien der Firma Euroimmun.

Kalibration/Rückführbarkeit:

-

Analysenfrequenz:

Täglich von Montag – Freitag

Die Bestimmung erfolgt in der ZEKCh ab dem:

31.05.2010, ab dem 07.08.2018 mit der neuen Musterbezeichnung nach ICAP

Literatur/Quelle der Referenzbereiche

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;73:17-23.

Andrade L, Klotz W, Herold M, et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* - 2018, online seit 29.05.2018, ahead of print.

Chan E, Andrade L. ICAP: International Consensus on ANA Patterns. Online seit 19.05.2015. <https://www.anapatterns.org> (20.07.2018)

Chan E, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:412.

Chan E, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, et al. Report on the Second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) Workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016;25:797–804.

Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. 4. überarbeitete Auflage. Lengerich. Pabst Science Publishers. 2012.

Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *The Journal of Experimental Medicine*. 1950;91(1):1-13.

Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, et al. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto-Immunity Highlights*. 2016;7(1):1.

Endler, G. EASI™ European Autoimmunity Standardisation Initiative. Pittfalls in der Autoimmundiagnostik. EASI Symposium am 27.10.2010, Salzburg. <http://www.oequasta.at/de/veranstaltungen/rueckblick-vortraege/easi-symposium-2010> (20.07.2018)

Herold M, Klotz W, Andrade L, et al. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* - 2018, online seit 10.04.2018, ahead of print.

Yazdany J, et al. Choosing Wisely: The American College of Rheumatology's Top 5 List of Things Physicians and Patients Should Question. *Arthritis care & research*. 2013;65(3):329-339.
