

Die HEp-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik – Automatisierung und Standardisierung¹⁾

The HEp-2 cell as target for multiparametric autoantibody analyses: automation and standardisation

Rico Hiemann¹, Dirk Roggenbuck², Ulrich Sack³,
Ursula Anderer¹ und Karsten Conrad^{4,*}

¹ Hochschule Lausitz, Senftenberg, Deutschland

² GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Deutschland

³ Institut für Klinische Immunologie und
Transfusionsmedizin, Medizinische Fakultät der
Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

⁴ Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät, TU
Dresden, Dresden, Deutschland

Zusammenfassung

Trotz Einführung von Multiplex-Assays ist die Bestimmung von Autoantikörpern (AAK) mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil der Autoimmundiagnostik. Das Screening auf nichtorganspezifische AAK wird in der Routinediagnostik von autoimmunen rheumatischen Erkrankungen mittels indirekter Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen durchgeführt. Leider differieren die mit diesem Test erhaltenen Befunde z. T. recht erheblich auf Grund von objektiven (z. B. HEp-2-Zellfixierung) und subjektiven (z. B. Erfahrungswerte) Faktoren. Die Intra- und Interlaborvarianzen sind daher relativ hoch. Erste Ergebnisse von Evaluierungsstudien eines neu entwickelten Systems zur automatischen Bildanalyse (AKLIDES®) zeigen einen Weg in Richtung Standardisierung (bzw. Harmonisierung)

des HEp-2-Zell-Assays auf, in dem zunächst subjektive Fehlinterpretationen vermieden werden können. Eine weitere Harmonisierung erfordert die Weiterentwicklung der Software-Algorithmen zur Mustererkennung sowie neue Kalibrationssysteme.

Schlüsselwörter: Autoantikörper; Automatisierung; HEp-2; Immunfluoreszenz.

Abstract

Analysis of autoantibodies (AABs) by indirect immunofluorescence (IIF) remains the hallmark of diagnosing autoimmune diseases despite the introduction of multiplex techniques. Non-organ specific AABs are screened in routine diagnostics by IIF on HEp-2 cells. However, IIF results vary due to objective (e.g., cell fixation) and subjective factors (e.g., expert knowledge). Therefore, inter- and intralaboratory variance is relatively high. Standardisation of AAB testing by IIF remains a crucial issue in and between routine laboratories and may be improved by automated interpretation systems. A novel automated reading system provides fully automated reading of fluorescence images on HEp-2 cells and software algorithms for the mathematical description of AAB staining patterns. It can be used for screening and preclassification of non-organ specific AABs in routine diagnostics regarding systemic autoimmune and autoimmune liver diseases. More sophisticated pattern recognition algorithms and novel calibration systems will improve standardised quantifications of IIF image interpretation.

Keywords: autoantibodies; automation; HEp-2; immunofluorescence.

Einleitung

Ein wesentliches Charakteristikum von Autoimmunerkrankungen ist die Produktion von erkrankungsspezifischen

¹⁾ Dieser Artikel ist eine überarbeitete Version aus dem Buch: Conrad K, Lehmann W, Sack U, Schedler U. (Hrsg): Multiparameteranalytik- Methoden, Applikationen, Perspektiven. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Bremen, Miami, Riga, Viernheim, Wien, Zagreb, 2008, S. 98–117, mit freundlicher Genehmigung von Pabst Science Publishers.

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

Autoantikörpern (AAK). Derartige AAK sind wertvolle serologische Marker für die Diagnostik der entsprechenden Erkrankung. So ist die Bestimmung von nichtorganspezifischen AAK essentiell im Rahmen der Diagnostik und Differenzierung von chronisch-entzündlich rheumatischen Erkrankungen (z. B. systemischer Lupus erythematodes, Sharp-Syndrom, Sklerodermie, idiopathische Myositis) sowie autoimmunen Lebererkrankungen (z. B. autoimmune Hepatitis, primär biliäre Zirrhose) [1–5]. Die laborinterne Strategie bezüglich Screening und Differenzierung nicht-organspezifischer AAK kann hierbei recht verschieden sein [6–8]. Empfohlen (und in den meisten Routinelabors auch praktiziert) wird eine Stufendiagnostik, bei welcher zunächst mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) an HEp-2-Zellen auf das Vorliegen relevanter AAK getestet wird. Anhand des Fluoreszenzmusters und der klinischen Fragestellung erfolgt im zweiten Schritt die Bestimmung der AAK-Spezifität mit spezifischen Immunoassays wie ELISA oder

Line-Immunoassay. Somit nimmt der HEp-2-Zell-Assay eine zentrale Stellung im Rahmen der Diagnostik der o. g. Autoimmunerkrankungen ein.

Bedeutung des Autoantikörperscreenings an HEp-2-Zellen

Bereits 1957 wurden Autoantikörper (AAK) gegen nukleäre Antigene (ANA: antinukleäre Antikörper) mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen [9]. Das traditionelle Substrat für den ANA-Nachweis war zunächst die Rattenleber. Seit mehr als 20 Jahren werden HEp-2-Zellen, die als Monolayer auf Glasobjektträgern wachsen, für das AAK-Screening verwendet. Auf Grund des humanen Ursprungs, der großen Zellkerne und der hohen Rate an Zellteilungsphasen haben HEp-2-Zellen gegenüber Rattenleber zahlreiche Vorteile wie höhere Sensitivität des AAK-Nachweises,

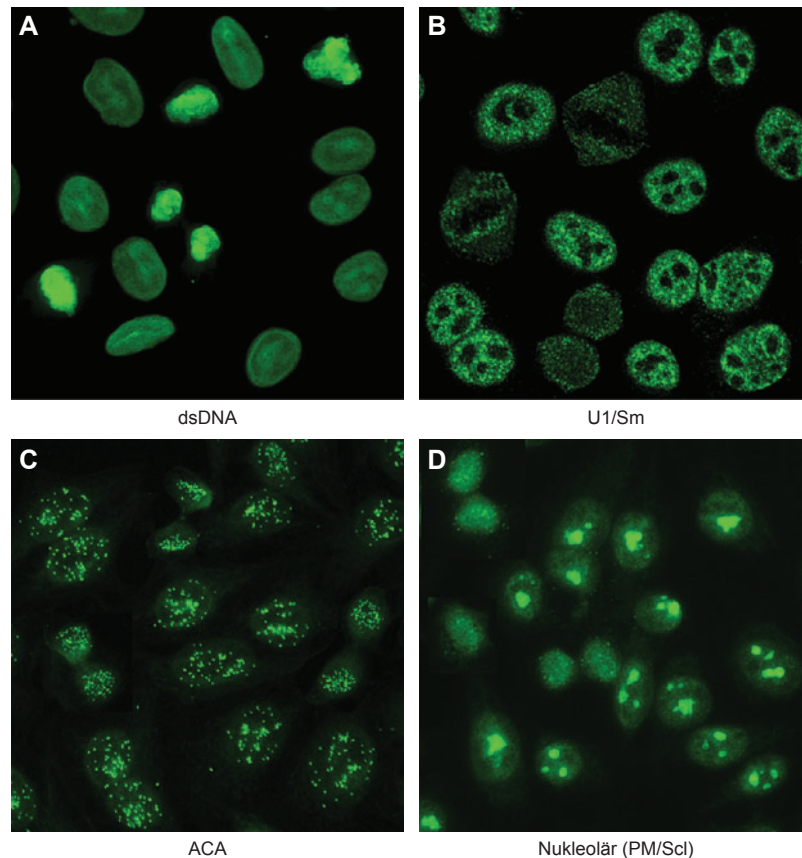


Abbildung 1 Nukleäre Fluoreszenzmuster an HEp-2-Zellen mit starker Assoziation zu AAK-Spezifität und Erkrankung.

(A) Homogene Fluoreszenz der Zellkerne sowie der Chromatinregion mitotischer Zellen: bei diesem Muster liegen in über 90% AAK gegen dsDNA vor; (B) granuläre Kernfluoreszenz mit Prominenz spliceosomaler Foci und Aussparung der Nukleoli, Chromatin der Mitosephasen negativ: bei diesem Muster liegen fast ausschließlich AAK gegen spliceosomale Proteine (Sm-, U1-RNP-Antikörper) vor; (C) punktförmige Fluoreszenz der Zellkerne sowie der Chromatinregion der Mitosezellen: typisches Muster der Anti-Centromer-Antikörper (ACA), welche in >95% gegen CENP-B gerichtet sind; (D) Fluoreszenz der Kernkörperchen (Nukleoli): im Gegensatz zu nichttransformierten Zellen sind bei den HEp-2-Zellen meist mehrere Nukleoli im Zellkern: antinukleolärer Antikörper. Diesem Muster können verschiedene AAK gegen nukleoläre Antigene zu Grunde liegen (PM/Sci: dieses Bild, Fibrillarin, Th/To). Muster (A) und (B) sind stark mit dem SLE, (B) zusätzlich mit der MCTD und Muster (C) und (D) mit der systemischen Sklerose (Sklerodermie) assoziiert.

Differenzierungsmöglichkeit der AAK entsprechend der Bindung an subzelluläre Strukturen und Nachweisbarkeit zusätzlicher AAK-Spezifitäten.

Viele der an HEp-2-Zellen detektierbaren AAK haben eine große Bedeutung in der Diagnostik und Prognostik von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sowie anderen Autoimmunerkrankungen erlangt [10]. Die Bestimmung von nichtorganspezifischen AAK erfolgt in verschiedenen Laboratorien über unterschiedliche Strategien. Eine optimale Analytik schließt das IIF-Screening an HEp-2-Zellen im Rahmen einer Stufendiagnostik ein. Die Vorteile einer solchen Strategie können wie folgt zusammengefasst werden: (a) hochsensitives Screening auf mehr als 30 klinisch relevante AAK-Spezifitäten, (b) spezifischer Nachweis von an ihrem Bindungsmuster erkennbaren AAK (z.B. Anti-Centromer-Antikörper), (c) kosteneffektiver Einsatz nachfolgender Untersuchungen je nach Immunfluoreszenzmuster und diagnostischer Fragestellung, (d) Möglichkeit des Nachweises seltener, aber diagnostisch relevanter AAK, für welche keine kommerziellen Assays zur Verfügung

stehen (z. B. Th/To-Antikörper) sowie (e) Möglichkeit des Nachweises von seltenen AAK unbekannter Feinspezifität, aber potenzieller klinischer Relevanz (z. B. AAK gegen Midbody-, Zentrosom- oder Golgi-Apparat-Antigene). Darüber hinaus können potentiell falsch positive Ergebnisse in den „spezifischen“ Assays (z. B. durch mit Autoantigenen kreuzreagierende antimikrobielle Antikörper oder durch Antikörper, welche gegen Blockierungsproteine gerichtet sind) erkannt werden. Somit fungiert der HEp-2-Zelltest als einfach durchzuführender multiparametrischer Assay, welcher für die Stufendiagnostik eine kosteneffektive und hoch qualitative AAK-Analytik im Rahmen der Diagnostik chronisch entzündlich-rheumatischer Erkrankungen erlaubt. Allerdings ist die Methode auf Grund des hohen Aufwandes an manuellen Arbeitsschritten und durch die visuelle Auswertung der fluoreszenzoptischen Muster mit deutlichen Nachteilen behaftet. Sie verursacht einen hohen Zeit- und Personalaufwand, ist bislang nicht zufriedenstellend automatisierbar und erschwert durch die subjektive Auswertung die Standardisierung.

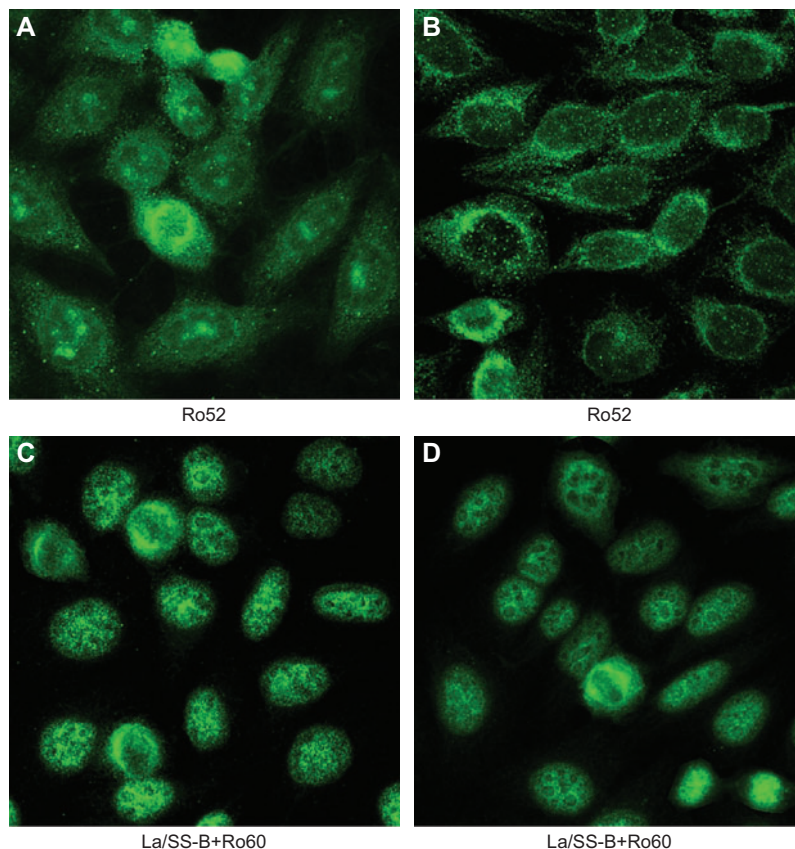


Abbildung 2 Fluoreszenzmuster an HEp-2-Zellen von Ro/SS-A und La/SS-B positiven Seren.

In Abhängigkeit von der Kultivierung und der Fixation der HEp-2-Zellen, aber auch der Feinspezifität der AAK, können Ro/La-positive Seren recht unterschiedliche Färbemuster an HEp-2-Zellen verursachen. So können beispielsweise monospezifische Ro52-Antikörper positive Seren ein granuläres Muster mit Prominenz der Nukleoli (A) als auch zytoplasmatische feingranuläre Färbungen (B) verursachen. In (C) und (D) sind Färbemuster von hochtitrigen La/SS-B-Antikörpern in Kombination mit niedrig- (C) und hochtitrigen (D) Ro60-Antikörpern zu sehen.

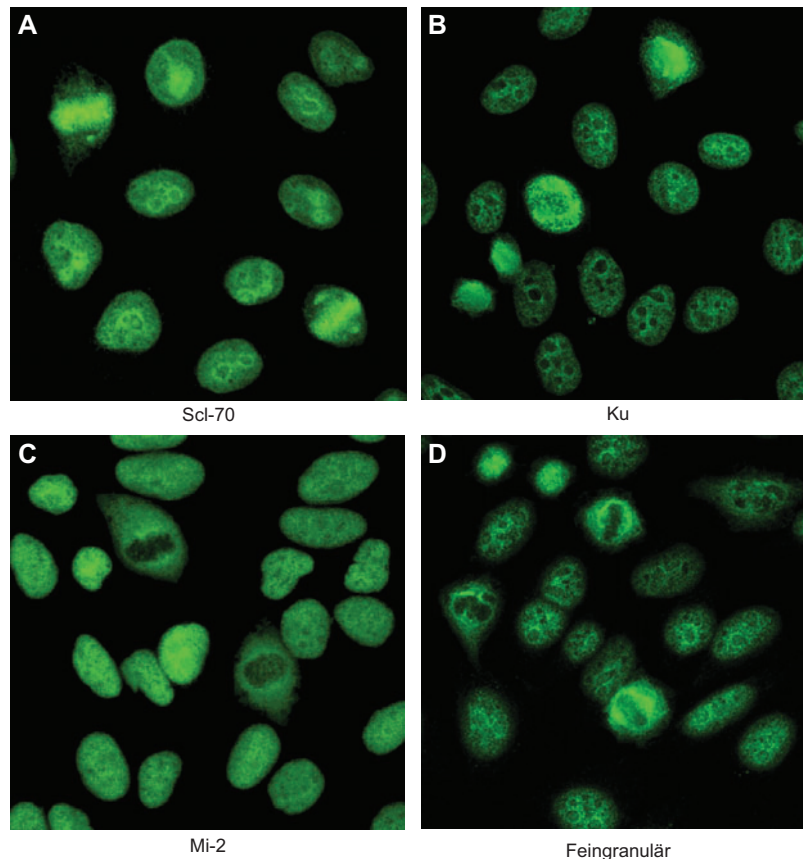


Abbildung 3 Nukleäre Fluoreszenzmuster an HEP-2-Zellen mit geringer Assoziation zu AAK-Spezifitäten.

(A) Homogen bis feingranuläre Fluoreszenz der Zellkerne mit Prominenz der Nukleoli und feingranuläre Fluoreszenz des Chromatins der Mitosezellen: typisches, jedoch nicht spezifisches Muster der Scl-70-Antikörper (Zielantigen: DNA-Topoisomerase I, daher Chromatinfärbung); (B) feingranuläre Kernfluoreszenz eines Serums mit Ku-Antikörpern, Chromatin in Meta- und Telophase negativ; (C) feingranuläre Kernfluoreszenz eines Serums mit Mi-2-Antikörpern, Chromatin in Metaphase negativ; (D) feingranuläre Kernfluoreszenz ohne nachweisbare AAK-Spezifität: häufiger ANA-Befund in der Routinediagnostik.

Übersicht über Immunfluoreszenz-Muster an HEP-2-Zellen und nachweisbare AAK-Spezifitäten

Das Primärscreening auf antinukleäre Antikörper (ANA) und andere nichtorganspezifische AAK erfolgt mittels IIF auf als Monolayer gewachsene und anschließend fixierte HEP-2-Zellen. Die Immunreaktion von über 100 AAK-Spezifitäten erzeugt mehr als 30 verschiedene, mehr oder weniger gut voneinander unterscheidbare Fluoreszenzmuster. Je nach Lokalisation des Zielantigens (bzw. der Zielantigene) können verschiedene nukleäre (z. B. homogene, verschieden granuläre, nukleoläre, zentromere, periphere sowie verschiedene dotförmige Kernfärbungen), zytoplasmatische (z. B. homogene, verschieden granuläre, mitochondriale oder zytoskeletale Muster) oder Zellzyklus-assoziierte Färbungen differenziert werden (Abbildungen 1–6).

In Tabelle 1 sind die Grundmuster, aber auch seltene Färbemuster von auf HEP-2-Zellen detektierbaren AAK aufgelistet. Der Unterscheidung dieser Muster sind jedoch in

Abhängigkeit von der Erfahrungheit des Diagnostikers und der Qualität der verwendeten Zellpräparationen enge Grenzen gesetzt. Insbesondere die Ko-Expression verschiedener AAK verursacht oft kontroverse Befundungen. Hier könnte ein automatisierbares System mit einer objektiven Erfassung der fluoreszenzoptischen Bilder einen Durchbruch bedeuten. Aus der Möglichkeit, geringste Helligkeitsunterschiede zu messen und überlappende Bilder separat zu analysieren, resultieren mit den heutigen Algorithmen zur komplexen Mustererkennung vielversprechende Ansätze zur automatischen Bildanalyse.

Automatisierung des HEP-2-Zell-Assays

Technologische Basis für das automatisierte Screening von Autoantikörpern [11, 12]

Für das automatische Screening von nichtorganspezifischen AAK mittels IIF an HEP-2-Zellen wurde ein auf einem Fluoreszenzmikroskop basierendes System (Mikroskop

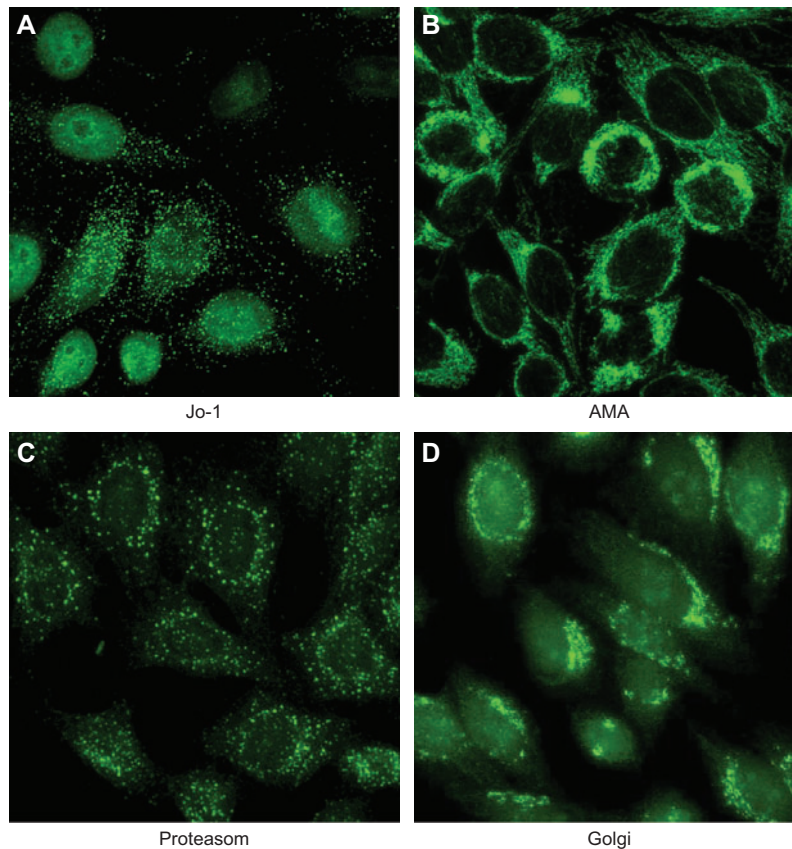


Abbildung 4 Zytoplasmatische Fluoreszenzmuster an HEp-2-Zellen.

(A) Feingranulär-punktförmige Färbung des Zytoplasmas: typisches Muster für AAK gegen tRNA-Synthetasen (hier Jo-1-Antikörper); (B) strichförmige Färbung des Zytoplasmas: typisches Muster der antimitochondrialen Antikörper (AMA; hier AMA-2 eines PBC-Patienten); (C) große zyttoplasmatische Dots: typisches Muster für AAK gegen Proteasomen; (D) irregulär grobgranuläre (zwiebelschalenförmige) zyttoplasmatische Färbung, meist polar an einer Seite des Zellkerns (wie eine Kappe) aufgelagert: typische Färbung der AAK gegen Golgi-Apparat-Antigene.

IX81 mit Objektiv 40X NA 0,6 LWD, Olympus, Tokyo, Japan) verwendet. Für die Messung der Immunfluoreszenz wurden Filterkombinationen für die Fluoreszenzfarbstoffe 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und Fluorescein-isothiocyanat (FITC) sowie Hochtransmissionsfilter (FITC [EX: 482/35 DI: 506 EM: 536 /40], DAPI [EX: 377/50 DI: 409 EM: 447/60], Semrock, Rochester, USA) eingesetzt. Als Aufnahmeparameter wurde ausschließlich die Belichtungszeit der Kamera über die Auswertung der aktuell aufgenommenen Bilder gesteuert, andere Parameter blieben unverändert. Die homogene Markierung der HEp-2-Zellkerne durch DAPI erlaubt die Zuordnung der Lage sowie die Unterscheidung der Zellzyklusphase jeder Zelle. DAPI lagert sich in die DNS der Zelle ein, wodurch typische mitoseabhängige Muster, die auf Kondensierung der DNS beruhen, erkennbar sind. Der zweite Fluoreszenzkanal wurde ausschließlich für die Erkennung des Immunfluoreszenzmusters, ausgelöst durch den Autoantikörper im Serum des Patienten, verwendet. Während der Aufnahme des Präparates erfolgte pro Bildszene eine Aufnahme mit beiden Fluoreszenzkanälen.

Objektive Musterbeschreibung

Das Grundprinzip für ein effizientes und schnelles Screeningssystem war die Reduktion der Datenmenge. Vorfilterungsschritte reduzierten die Datenmenge und erhöhten den Probendurchsatz bei verringertem Rechenzeitbedarf. Die Analyse erfolgte mit einem baumbasierten hierarchischen Ablauf. Mit steigender Knotenanzahl erhöhte sich die Spezialisierung der verwendeten Algorithmen. Einfache, wenig komplexe Algorithmen wurden im Wurzelbereich des Datenbaumes angewendet und ermöglichten die universelle Vorfilterung der Objekte. Spezialisierte Algorithmen, die vorab bekanntes Wissen einbinden, z. B. Zellgröße und -form, ermöglichten die Feindifferenzierung und die frühzeitige Beseitigung von Störungen und Artefakten. Der Rechenaufwand wurde in den nachfolgenden Schritten durch die Anwendung von a-priori Wissen reduziert, indem z. B. zu kleine Objekte bei Berechnungen ausgeschlossen wurden. Die grundlegende Analyseketten der Bildverarbeitung gliederte sich in folgende Schritte, die sequentiell abgearbeitet wurden: a) Aufnahme, b) Qualitätskontrolle, c) Segmentierung, d) Objektbeschreibung,

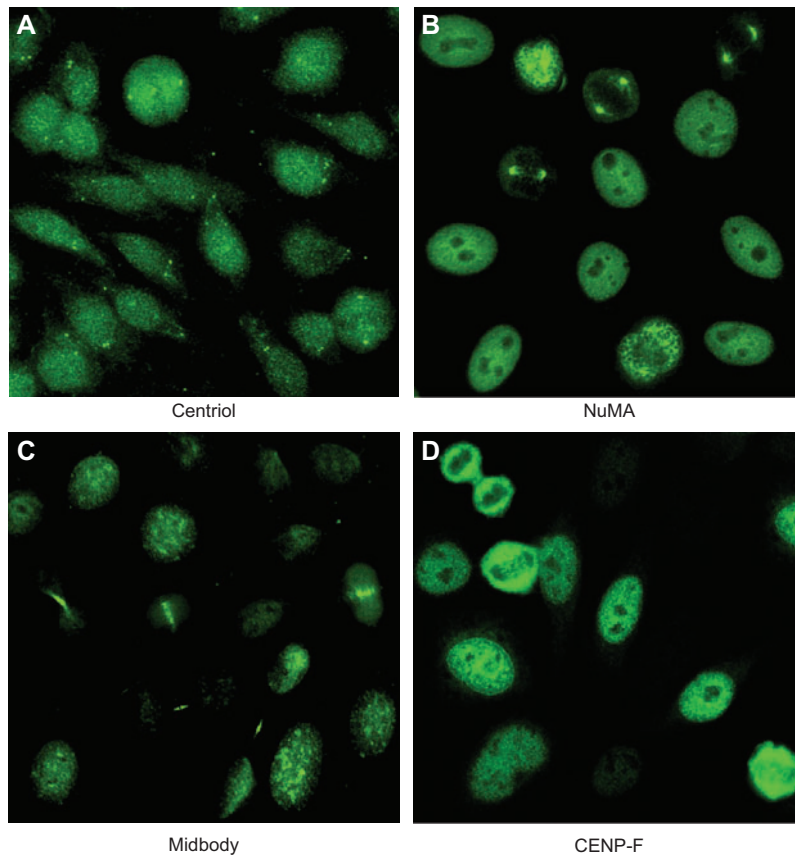


Abbildung 5 Zellzyklus-assoziierte Fluoreszenzmuster.

(A) Färbung von ein oder zwei Punkten in der Nähe der Kernmembran der Interphasekerne und Färbung der Centriolen an den Polen der mitotischen Spindel: typisches Muster der Centrosom/Centriol-Antikörper; (B) granuläre Färbung der Zellkerne der Interphasezellen (Nukleoli sind meist ausgespart) sowie starke Färbung der polaren Region der mitotischen Spindel: typisches Muster der NuMA-Antikörper („nukleärer mitotischer Apparat“); (C) Färbung der Midbody-Region (Zellteilungsfurche) in Ana- und Telophase sowie granuläre Färbung des Chromatins in der Metaphase: typisches Muster für Midbody-1-Antikörper; (D) variable granuläre Kernfärbung der Interphasezellen und punktförmige Färbung des Chromatins in Prometa- und Metaphase: typisches Muster der AAK gegen CENP-F.

e) Objektklassifikation. Durch Parallelisierung der Bildanalyse mit speziellen Algorithmen konnten Geschwindigkeitsvorteile erzielt werden. Im Vergleich zur Rechengeschwindigkeit war der Speicherbedarf der aufgenommenen Bilddaten zu vernachlässigen.

Das vorhandene Wissen über den Aufbau und die Abbildung eines fluoreszenzgefärbten Präparates mit adhärenenten HEp-2-Zellen wurde verwendet, um Qualitätskriterien, wie z. B. die maximal plausible Objektgröße, zu definieren. Nach der Bildaufnahme wurde die Bildqualität mit den beschriebenen Parametern gemessen. Bei der Verletzung eines Qualitätskriteriums erfolgte der Ausschluss der Bildszene für die nachfolgende Analyse. Dadurch wurde sichergestellt, dass ausschließlich korrekt aufgenommene Szenen mit den komplexeren Verfahren der nachfolgenden Schritte weiterverarbeitet wurden.

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzmuster wurden zirka 200 Merkmale implementiert, die durch Variation merkmalspezifischer Parameter zirka 1400 beschreibende Merkmale ergaben. Implementiert für die Beschreibung der

Zellmuster wurden Parameter der Gruppe der statistischen, morphometrischen und formbeschreibenden Merkmale. Die Vergleichbarkeit der Aussagen von digitalen Parametern und herkömmlicher Musterklassifikation konnte realisiert werden, weil die mathematische Modellierung (Übersetzung) von bekannten Musterbeschreibungen aus der Medizin/Biologie genutzt wurde.

Differenzierung zwischen positiven und negativen Befunden

Ziel des Einsatzes eines automatischen Systems zum Screening auf nichtorganspezifische AAK ist zunächst die möglichst objektive Differenzierung zwischen positiven und negativen Befunden. Es gibt jedoch keinen goldenen Standard für die Definition positiver Reaktivitäten an HEp-2-Zellen. Daher müssen für die Evaluierung eines solchen Systems sowohl die AAK-Spezifitäten als auch der klinische Hintergrund in die Bewertung einbezogen werden. So müssen z. B. bei Serien von Patienten mit Kollagenosen

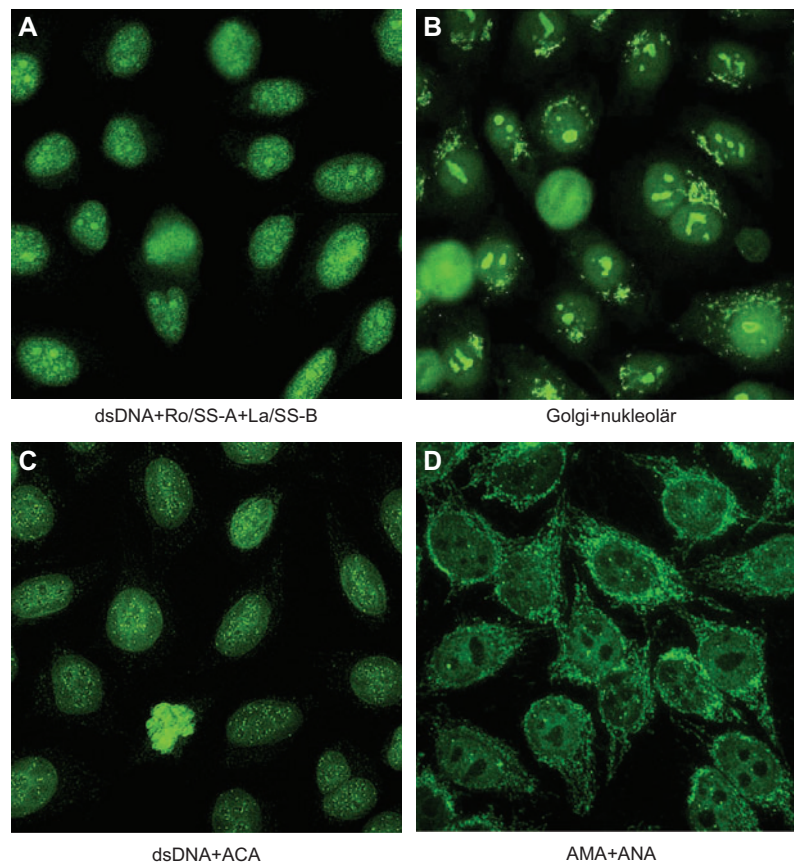


Abbildung 6 Beispiele von Musterkombinationen an HEp-2-Zellen.

(A) Kombination von Ro/SS-A-, La/SS-B- und dsDNA-Antikörpern (Serum eines SLE-Patienten); (B) Kombination von AAK gegen Golgi-Apparat- und nukleoläre Antigene (Serum eines Patienten mit Verdacht auf Kollagenose); (C) extrem seltene Kombination von dsDNA- und Anti-Centromer-Antikörpern (Serum eines Patienten mit SLE-CREST-Overlap!); (D) Kombination von antimitochondrialen Antikörpern mit sp100-Antikörper sowie einem antinukleären Antikörper unbekannter Spezifität (Serum eines PBC-Patienten).

und definierten AAK-Spezifitäten positive Reaktivitäten messbar sein. Andererseits sollten Seren von Blutspenden, welche keine derartigen AAK-Spezifitäten aufweisen, in der Regel negativ bewertet werden (Ausnahme: AAK unbekannter Spezifität und ohne klinische Relevanz). In einem ersten Evaluierungsschritt untersuchten wir 263 gesunde Blutspender, 159 interne Referenzseren mit verschiedenen AAK-Spezifitäten (in den Abbildungen 1 bis 6 sind einige der Färbemuster dieser Seren zusammengestellt) sowie 80 unselektierte Seren aus der Routinediagnostik. Der Vergleich visuelle vs. automatische Befundung der 502 analysierten Seren in Bezug auf negative, borderline (grenzwertige) und positive Befunde ergab eine Übereinstimmung von 94,6% [12]. Die Übereinstimmung erreichte 97,2% bzw. 96,6%, wenn die Borderline-Befunde entweder als negativ oder als positiv bewertet wurden. Die meisten Differenzen waren bei den Blutspenderseren mit grenzwertigen Reaktivitäten, welche entweder bei der visuellen oder bei der automatischen Auswertung nicht eindeutig als positiv oder als negativ befundet werden konnten, zu finden. Eine aus diagnostischer Sicht objektive Positiv/-

Negativ-Unterscheidung mittels dieses neu entwickelten Systems (AKLIDES®) kann aus folgenden Ergebnissen abgeleitet werden: (a) Die Einsatz der internen Referenzseren mit gut definierten AAK-Spezifitäten von Patienten mit Kollagenosen und primär biliärer Zirrhose erbrachte eine 100%ige Übereinstimmung. (b) Seren mit Borderline-Befunden der visuellen Bewertung, welche im AKLIDES® positiv bewertet wurden, waren in ca. 35% positiv für einen klinisch relevanten AAK. Dagegen waren die im AKLIDES® negativ befundenen Seren, welche visuell als borderline (meist fraglich feingranulär bei 1:80) bewertet wurden, auch negativ für die Kollagenose-relevanten ANA-Spezifitäten. Die mit AKLIDES® ermittelten Befunde stimmen damit gut mit den Ergebnissen von Kang überein, welche aufzeigten, dass bei ANA-Befunden mit einem Titer von 1:160 oder niedriger die Wahrscheinlichkeit von bestimmten ANA-Spezifitäten (Sm, U1-RNP, Scl70, Ro/SS-A, La/SS-B) sehr gering ist [13]. In einer weiteren Studie, welche 924 konsekutiv im Rahmen der Routinediagnostik gesammelte Seren untersuchte, lag die Übereinstimmung zwischen visueller und automatischer

Tabelle 1 In der indirekten Immunfluoreszenz an HEP-2-Zellen differenzierbare Färbemuster in Abhängigkeit von der Lokalisation der Zielantigene. Diagnostisch relevante Autoantigene sowie spezifische Assoziationen sind fett gedruckt.

HEP-2-Muster	Antigene(e)	Krankheitsassoziation(en)
A1 Färbung der Zellkerne (ANA)	Nukleäre Antigene (Chromatin, Nukleoplasma, Kernmembran)	Kollagenosen Autoimmune Lebererkrankungen
Homogen	dsDNA , Histone, Nukleosomen	SLE
Kernmembran	Kernporenkomplex-Antigene: gp210 , Nukleoporin p62 Lamin-B-Rezeptor (LBR) Lamine (A, B1, B2, C)	PBC (Myositis: PM, MCTD) PBC APS/SLE (LA-positiv), Thrombozytopenie, CFS, autoimmune Lebererkrankungen
Grobgranulär (Nukleoli negativ)	Nukleäre Matrixproteine snRNP-Coreproteine (Sm) U1-snRNP-spezifische Proteine (U1-RNP) U2-snRNP-spezifische Proteine U4/U6-snRNP-spezifische Proteine	MCTD, Sklerodermie, SLE SLE MCTD , SLE, Sklerodermie
Feingranulär (Nukleoli können positiv sein)	Mi-2 Ro/SS-A, La/SS-B RNA-Polymerase II/III Ku-p79, -p80	Dermatomyositis SLE , Sjögren-Syndrom , Sklerodermie, Myositis Sklerodermie , (SLE) Myositis-Sklerodermie-Overlap-Syndrom , SLE
Nukleäre Dots 1–6 Dots Multiple nukleäre Dots (5–10, max. 30 Dots) Centromeren-Dots (ACA)	Cajal Body-Antigene: p80-Coilin Nuklear Body-Antigene: Sp100 , PML, SUMO-1, -2 Centromer-Antigene: CENP-A, -B, -C	 PBC , Sjögren-Syndrom, SLE Sklerodermie , PBC
Homogen oder feingranulär (Nukleoli können positiv sein)	Scl-70 (DNA-Topoisomerase I)	Sklerodermie
A2 Färbung der Nukleoli (antinukleoläre AK)	Nukleoläre Antigene	Sklerodermie, Mischkollagenosen, Tumoren
Nukleolär homogen	PM-Scl TH/To (7-2 RNA und 8-2 RNA) Fibrillarin (snoRNP)	Myositis-Sklerodermie-Overlap-Syndrom Sklerodermie Sklerodermie
Nukleolär klumpig Nukleolär gesprenkelt mit mitotischen Punkten	RNA-Polymerase I NOR-90/hUBF	Sklerodermie Sklerodermie Sklerodermie (SLE, RA, Tumoren)
Nukleolär fein gesprenkelt	RNA-Helicase II (Gu)	Sklerodermie, SLE, undifferenzierte Kollagenosen
B1 Zytoplasma-Färbung	Zytoplasmatische Antigene (Zytosol, zytoplasmatische Organellen)	Kollagenosen, PBC
Feingranulär bis wolkig (Nukleoli meist positiv)	Ribosomale Antigene: ribosomale P-Proteine , 28S rRNA, S10, Ja, L12, L5/5S	SLE
Feine zytoplasmatische Dots	Jo-1 (Histidyl-tRNA Synthetase)	Polymyositis , Dermatomyositis
Feingranulär bis homogen	SRP-54	Polymyositis , Dermatomyositis
Granulär-filamentös	Mitochondrien-Antigene: PDC-E2	PBC , Sklerodermie
Große unregelmäßige Dots/Flecken	Endo-/lysosomale Antigene: hLAMP-2 GW-Body-Antigene	GN bei ANCA-assoziiierter Vaskulitis
Irregulär, grobgranulär (meist kapfenförmig an einer Seite des Zellkerns angelagert)	Golgi-Komplex-Antigene: Golgine, Makrogolgin	SLE, Sjögren-Syndrom
B2 Zytoskelett-Färbung	Antigene von Mikrotubuli, Intermediär- und Mikrofilamenten	
Feine Fasern längs der Zelle Netzartige Filamente, zytoplasmatische Punkte in Mitosen	F-Aktin Zytokeratin	Autoimmunhepatitis

Tabelle 1 (Continued)

HEp-2-Muster	Antigene(e)	Krankheitsassoziation(en)
Druckfasern längs der Zelle Fein verwobene Fasern	Tropomyosin Vimentin	
C Zellzyklus-Muster		Kollagenosen, Tumoren
Pleomorphe Kernfärbung Dots (Centromeren) in Pro- und Metaphase; variable Kernfärbung in Interphase	DNA-Polymerase δ (PCNA) CENP-F	SLE Tumoren
1 oder 2 Dots in Nähe der Kernmembran; Dots an Spindelpolen Mitosespindel	Centriol/Centrosom-Antigene: z.B. Pericentrin, Ninein, PCMI, Mob1	Sklerodermie, postinfektiöse cerebellare Dysfunktion
Polare Region der mitotischen Spindel+granuläre Kernfärbung	Tubulin NuMA (Centrophilin)	Kollagenosen
Midbody-Region Spindelpole/-fasern+ Midbody-Färbung	Midbody-Antigene (Filamin?) HsEg5	Sklerodermie SLE, Sjögren-Syndrom

ACA, Anti-Centromer-Antikörper; ANA, antinukleäre Antikörper; ANCA, anti-neutrophil zytoplasmatische Antikörper; APS, Antiphospholipid-Syndrom; CENP, *Centromer-Protein*; CFS, *chronic fatigue syndrome*; GN, *Glomerulonephritis*; LA, Lupus-Antikoagulan; LAMP-2, Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2; MCTD, *mixed connective tissue disease* (Sharp-Syndrom); NuMA, nukleärer mitotischer Apparat; PBC, primär biliäre Zirrhose; PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*; PM, *polymyositis*; RA, rheumatoide Arthritis; RNP, Ribonukleoprotein; SLE, systemischer Lupus erythematodes; SRP, *signal recognition particle*.

Tabelle 2 Vergleich der automatischen Titerabschätzung mit den konventionell austitrierten Werten.

Serum	Software	Austitriert	Spezifität
1	320	640	dsDNA/SS-A
2	320	320	dsDNA/SS-A
3	640	640	SS-A/SS-B
4	2560	5120	SS-A/SS-B
5	1280	1280	RNP
6	320	320	RNP
7	320	640	Sm
8	1280	2560	RNP
9	1280	1280	Scl-70
10	640	AMA 320, CENP >5120	AMA+CENP
11	2560	5120	Sm/RNP
12	2560	>5120	PMScl
13	1280	1280	SS-A/SS-B
14	2560	5120	dsDNA/SS-A

Auswertung bei 93%, wobei auch hier die größten Differenzen im niedrigtitrigen Bereich lagen [14].

Automatische Mustererkennung

Neben der diagnostischen Fragestellung gibt auch das Fluoreszenzmuster wichtige Hinweise für die nach dem AAK-Screening auf HEp-2-Zellen zu untersuchenden AAK-Spezifitäten (siehe Tabelle 1). Für die automatische Mustererkennung erfolgt daher folgende hierarchische Bearbeitung der Fluoreszenzsignale: (I) Positivität, (II) Lokalisation

(Zellkern, Zytoplasma, Chromatin mitotischer Zellen), (III) nukleäres Muster (homogen, granulär, nukleolär, centromer, multiple Dots). Im ersten Schritt der automatischen Mustererkennung sollen 6 Hauptmuster mit folgenden Kriterien differenziert werden: (a) zytoplasmatisch (granuläre oder homogene zytoplasmatische Färbung oberhalb des cut-off Wertes), (b) homogen (homogene oder granuläre Kernfärbung und Färbung des Metaphasechromatins), (c) granulär (fein-, mittel- oder grobgranuläre Färbung der Interphasekerne), (d) nukleolär (homogene oder granuläre Färbung der Nukleoli ohne oder mit geringer Färbung des Nukleoplasmas), (e) centromer (>30 nukleäre Dots im Interphasekern und im Metaphasechromatin), (f) multiple nukleäre Dots (<30 nukleäre Dots im Interphasekern). In einer ersten Evaluierung wurden 139 gut charakterisierte, monospezifische Seren untersucht. Mit Ausnahme von Ro52- und Ro60-Antikörper positiven Seren, welche teilweise eine nukleäre und zytoplasmatische Färbung zeigten, konnten alle zytoplasmatischen AAK (anti-Jo-1, AMA, anti-Golgi, anti-ribosomal) von den ANA differenziert werden (12). AAK mit sehr charakteristischem Fluoreszenzmuster (dsDNA-, Sm/RNP- und Anti-Centromer-Antikörper) konnten in allen Fällen dem typischen ANA-Muster (s. Tabelle 1) zugeordnet werden. Bei AAK mit eher variablen Färbemustern (z. B., Ro- und Scl-70-Antikörper) war die Zuordnung zu den 5 nukleären Hauptmustern erwartungsgemäß nicht eindeutig. Die Musterdifferenzierung wird auch dadurch erschwert, dass bei erkrankten Patienten mehrere der relevanten AAK-Spezifitäten, aber auch andere AAK unbekannter Spezifität, vorkommen können. So ist es sicherlich nicht

verwunderlich, dass ein Mustervergleich zwischen visueller und automatischer Befundung unter Routinebedingungen in 15,3% differierende Ergebnisse erbrachte [14].

Automatische Titerabschätzung

Titer sind Maßangaben für Verdünnungen von Antikörpern, die gerade noch eine eindeutige positive Antigen-Antikörper-Reaktion ergeben. Über die Intensität des Bildes der Kamera lässt sich der Endtiter des Serums schon bei einer Eingangsverdünnung von 1:80 abschätzen. Dafür muss vor der Messung das System über mehrere Seren mit definiertem Titer einkalibriert werden. Erreicht eine Serumverdünnung in der Praxis diese mittlere Endtiterintensität, wurde der Endtiter des Serums erreicht. Tabelle 2 zeigt den Vergleich der automatischen Titerabschätzung mit den konventionell ausgetitrierten Werten.

Perspektiven

Die erfolgreiche Automatisierung des HEP-2-Zell-Assays (automatische Fokussierung, Bildaufnahme, Messung, Auswertung sowie Bild- und Datenarchivierung) bildet die notwendige Voraussetzung für eine Standardisierung bzw. Harmonisierung des IIF-Screenings auf nichtorgan-spezifische AAK. Eine weitere Entwicklung der Software-Algorithmen sowie der Kalibrationssysteme in Kombination mit Evaluierungsstudien wird zeigen, ob

- (a) die Färbemuster objektiver klassifiziert und weiter subklassifiziert werden können.
- (b) klinisch relevante AAK-Spezifitäten, deren typische Färbemuster durch andere AAK maskiert werden, zweifelsfrei detektiert werden können. So ist z. B. bei einer Ko-Expression von Anti-Centromer- und Anti-Sp100-Antikörpern das typische Sp100-Dot-Muster schlecht oder gar nicht sichtbar. Ein anderes Beispiel sind AAK gegen Antigene der verschiedenen Kompartimente der Kernmembran. Einige dieser AAK sind hochspezifisch für die PBC und scheinen auch prognostisch relevant zu sein (bezüglich Schwere und Progression der Erkrankung). Da diese häufig niedrigtitrig vorliegen, können sie durch höhertitrige antimitochondriale Antikörper (AMA) maskiert werden [15, 16].
- (c) mehr neue AAK gefunden werden können.
- (d) eine automatische Titerabschätzung eine Titrierung des Serums überflüssig macht.

Die Methodik der Aufnahme, Qualitätskontrolle und Bildarchivierung erlaubt es, die Entwicklung auch auf weitere diagnostische Tests auszuweiten. Exemplarisch sind hier der Nachweis von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA mittels *Crithidia luciliae* Immunfluoreszenztest (CLIFT) sowie der Nachweis von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) auf Granulozyten zu nennen. Die Möglichkeit zur Steuerung konventioneller Mikroskope erlaubt es nahezu alle bisher manuell ausgewerteten Mikroskop-basierten Tests zu automatisieren.

Für die Immundiagnostik kann damit ein erweitertes Einsatzgebiet, die „Teleimmunologie“, etabliert werden. Der Immunologe kann so zentral alle verzweigt erstellten Befunde verschiedener Geräte über die aufgenommenen hochqualitativen Bilddaten befunden. Detailliertere Beschreibungen über ergänzende Merkmale und weitere Berechnungen können dazu führen, dass neue Muster erkannt und sicher beschrieben werden. Die Erweiterung des bestehenden hierarchischen Klassifikationssystems kann durch exaktere Beschreibung der Muster zu einer verbesserten und zuverlässigeren Diagnostik führen.

Literatur

1. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1131–6.
2. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* 2003;2:211–7.
3. Fritzler MJ. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Rev* 2008;7:616–20.
4. Damoiseaux JG, Cohen Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006;5:10–7.
5. Sordet C, Goetz J, Sibilia J. Contribution of autoantibodies to the diagnosis and nosology of inflammatory muscle disease. *Joint Bone Spine* 2006;73:646–54.
6. Wiik AS. Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol* 2005;34:260–8.
7. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002;117:316–24.
8. Wiik A, Gordon TP, Kavanaugh AF, Lahita RG, Reeves W, van Venrooij WJ, et al., and the IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic Diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Rheum (Arthr Care Res)* 2004;51:291–8.
9. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br J Med* 1957;2:732–4.
10. Conrad K, Schöbber W, Hiepe F. Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Ein diagnostischer Leitfaden. 3. Auflage, Pabst Science Publishers, Lengerich, 2006.
11. Hiemann R, Hilger N, Michel J, Nitschke J, Böhm A, Anderer U, et al. Automatic analysis of immunofluorescence patterns of HEP-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2007;1109:358–71.
12. Hiemann R, Büttner T, Krieger T, Roggenbuck D, Sack U, Conrad K. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEP-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
13. 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.
14. Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, Weyer MG, Büttner T, Radau B, et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based

- immunofluorescence tests. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R40. Epub 2010 Mar 9.
15. Enarson P, Rattner JB, Ou Y, Miyachi K, Horigome T, Fritzler MJ. Autoantigens of the nuclear pore complex. *J Mol Med* 2004;82:423–33.
16. Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, et al. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. *J Autoimmun* 2003;20: 247–54.