

Validierung von CTD-Screen und anti-DFS70 Assays zur Optimierung der Stufendiagnostik bei positiven AC-2 ANA-Muster

Marina Radulovic, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Autoimmun- und Allergiediagnostik, ZLM Inselspital Bern

1. Zusammenfassung

Der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) auf human epithelial cell line type 2 (HEp-2 Zellen) gilt als Goldstandard zur Abklärung von Autoimmunerkrankungen. Anhand der verschiedenen ANA-Muster können erste Hinweise gewonnen werden, um welchen Autoantikörper (AAK) es sich handeln könnte. Ein häufiges Muster ist das anti-cell (AC)-2 Muster. Dieses Muster entsteht durch den anti-DFS70 AAK. Ist dieser isoliert-positiv (i.p.) vorhanden, sind also keine anderen AAK nachweisbar, kann gemeinsam mit der Klinik eine ANA-assoziierte rheumatische Erkrankung (AARE, synonym wird auch connective tissue disease (CTD) verwendet) ausgeschlossen werden. Damit im Labor ein i.p. anti-DFS70 AAK nachgewiesen werden kann, werden in dieser Arbeit je ein **anti-DFS70** und ein **CTD-Screen Assay** jeweils auf dem **Phadia™ 250** und dem **BIO-FLASH®** getestet. Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, diese Assays kombiniert als Stufenverfahren zu validieren. Ausserdem wird geprüft, ob die zusätzliche Bestimmung von anti-Histon und -Nukleosom AAK einen Mehrwert bringt, indem falsch-negative Resultate aufgedeckt werden. Die Ergebnisse zeigten unter den Geräten ähnliche anti-DFS70 Resultate, jedoch grössere Abweichungen im CTD-Screen Assay: BIO-FLASH® ergab mehr positive Ergebnisse als der Phadia™ 250. Welches Gerät dabei falsch-positiv oder falsch-negativ mass, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die zusätzliche Messung von anti-Histon und -Nukleosom AAK bei CTD-Screen-negativen Proben ergab einen Mehrwert von bis zu 28%. Auch bei isoliert-positiven anti-DFS70 Proben konnten dadurch falsche Ergebnisse vermieden werden (5 von 49 bei Phadia™ 250 bzw. 2 von 44 bei BIO-FLASH®). Jedoch werden bei beiden Stufenverfahren nicht alle IIF-positiven Proben mit AC-2 Muster erfasst, weshalb die Sensitivität und Cohens Kappa κ tief ausfallen. Für die weitere Evaluation des Stufenverfahrens muss die Klinik hinzugezogen werden.

2. Einleitung

Mit der IIF werden die ANA-Muster in verschiedene Gruppen klassifiziert. Eines davon ist das AC-2 Muster, welches eine feingranuläre Musterung im Zellkern und eine positive Färbung in den mitotischen Zellen zeigt [1]. Dieses Muster entsteht durch den anti-DFS70 AAK [1]. Dieser bindet an das DFS70 Protein, welches antiapoptotisch bei Zellstress wirkt [2].

Obwohl es sich hierbei um einen AAK handelt, konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass sein i.p. Vorkommen gemeinsam mit der Klinik der Patientinnen und Patienten als diagnostische Hilfe zum Ausschluss einer AARE verwendet werden kann [3, 4].

Die Identifizierung des AC-2 Musters mittels IIF erweist sich als schwierig. Deshalb soll für die Identifizierung eines anti-DFS70 ein anti-DFS70 Assay und für den Ausschluss anderer AAK ein CTD-Screen Assay getestet werden. Diese wurden in einem ersten Schritt auf dem Phadia™ 250 und auf dem BIO-FLASH® verglichen. Nun soll erforscht werden, wie sich die Kombination dieser Assays verhält und ob es für das Labor einen Mehrwert hat, anti-Histon und -Nukleosom AAK zum Ausschluss anderer AAK zu messen.

3. Ziele und Fragestellungen

Validation des Stufenverfahrens bestehend aus der Kombination der CTD-Screen Assays und dem anti-DFS70 Assays auf dem Phadia™ 250 (EliA™) und auf dem BIO-FLASH® (QUANTA Flash®) mit ergänzender Bestimmung der anti-Histon und -Nukleosom AAK auf dem DSX.

- Wie hoch ist der Anteil an positiven anti-Histon und -Nukleosom AAK in Seren, die negativ für CTD-Screen und anti-DFS70 AAK auf dem Phadia™ 250 und BIO-FLASH® sind?
- Wie viele falsch isoliert-positive anti-DFS70 Proben können mit der zusätzlichen Bestimmung von anti-Histon und -Nukleosom AAK vermieden werden?
- Bringt es für das Labor einen Mehrwert, anti-Histon und -Nukleosom AAK als ergänzenden Schritt im Stufenverfahren zu messen?
- Wie gross sind der Cohen's Kappa κ , die Sensitivität, Spezifität der kombinierten Stufendiagnostik im Vergleich zu der IIF?

4. Material, Methodik, Vorgehen

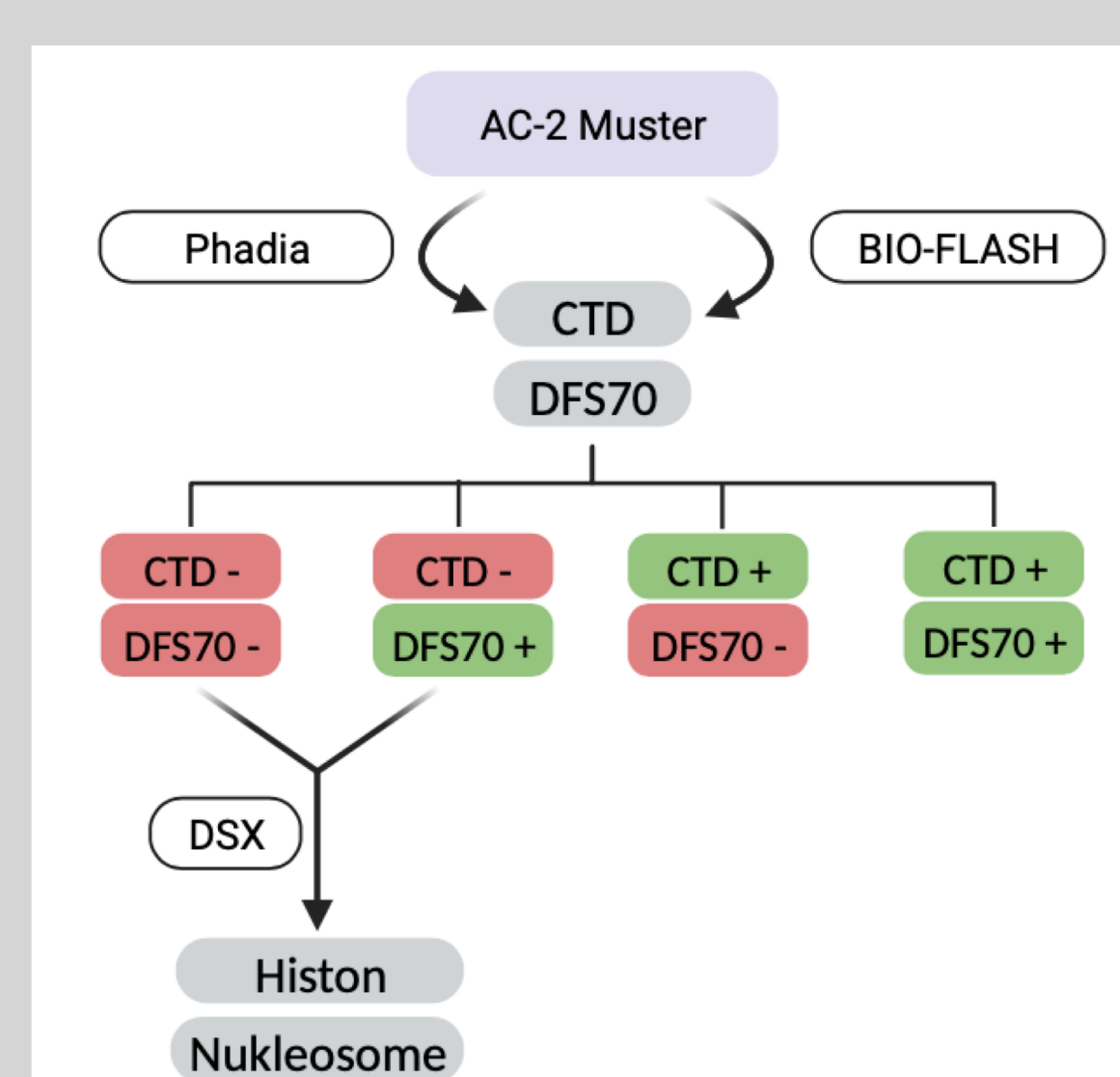


Abb. 1 Versuchsablauf (Radulovic, 2023)

Die Stichprobe bestand aus 242 positive AC-2 Seren mit einem Titer $\geq 1:320$ sowie 25 Negativseren ($<1:80$).

Alle Proben wurden auf den anti-DFS70 sowie CTD-Screen Assay auf dem Phadia™ 250 (Enzyme-linked Immunoassay) und auf dem BIO-FLASH® (Chemilumineszenz-Immunoassay) getestet. Der CTD-Screen Assay ist eine Poolzelle, welche 15 (Phadia™ 250) oder 16 (BIO-FLASH®) AARE-assoziierte AAK enthält.

Die Seren, die negativ im CTD-Screen Assay waren, wurden in einem nächsten Schritt auf anti-Histon und -Nukleosom AAK auf dem DSX (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) getestet. Der Ablauf ist auf der Abbildung 1 abgebildet.

5. Ergebnisse/ Resultate

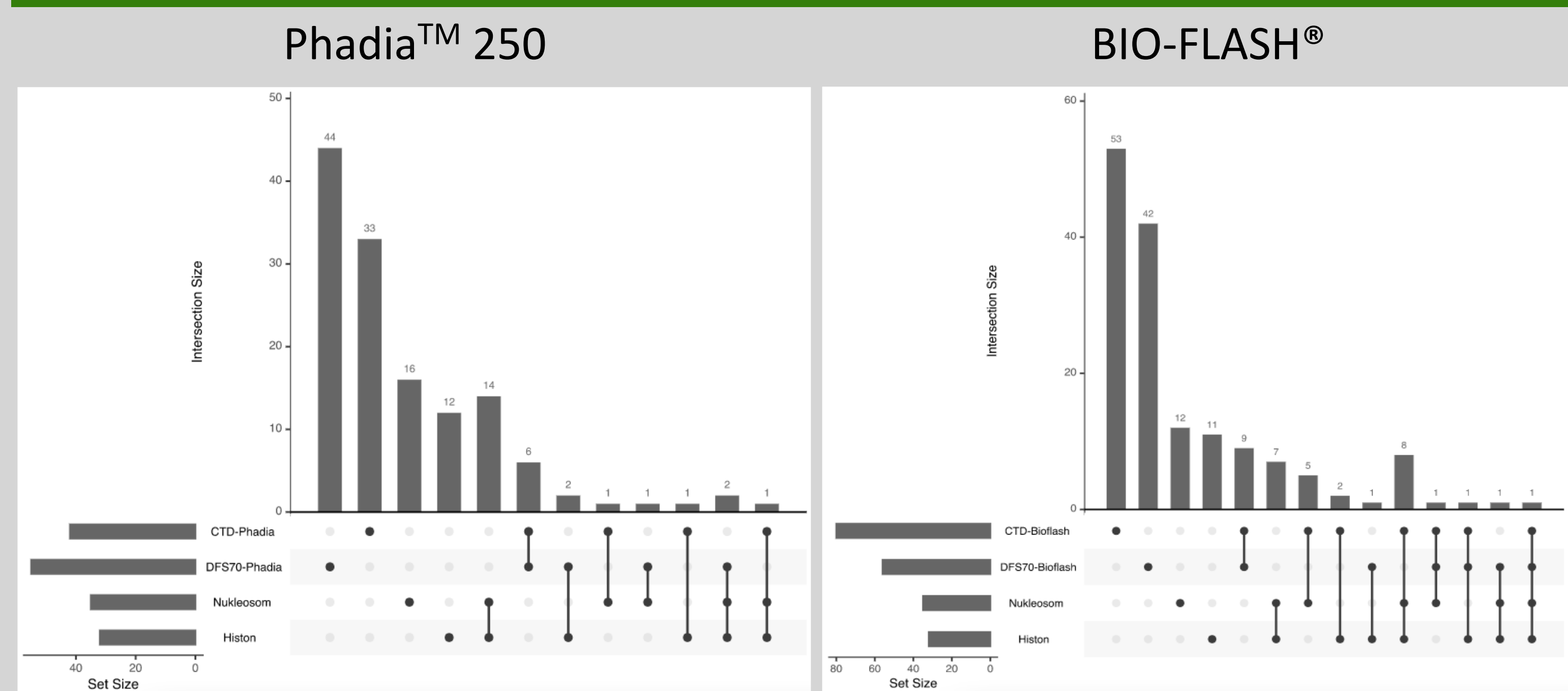


Abb. 2 Upset-Plot Phadia™ 250 (Nilius, 2023)

Abb. 3 Upset-Plot BIO-FLASH® (Nilius, 2023)

Sensitivität = 55%
Spezifität = 100%
Cohen's Kappa κ = 0.1860

Sensitivität = 63%
Spezifität = 92%
Cohen's Kappa κ = 0.2126

6. Diskussion

Durch den Miteinbezug von anti-Histon und -Nukleosom AAK konnten bei den i.p anti-DFS70 Proben noch 10% (Phadia™ 250) bzw. 5% (BIO-FLASH®) zusätzlich aufgedeckt werden. Am grössten ist der Mehrwehrt bei den Seren, die in beiden Assays negative Ergebnisse zeigten. Hier wurde bei 28% (Phadia™ 250) bzw. 25% (BIO-FLASH®) zusätzlich ein positives Resultat noch gemessen. Diese Werte sprechen klar für den Miteinbezug von anti-Histon und -Nukleosom AAK, weil diese Proben ansonsten verpasst worden wären.

Wird die neue Stufendiagnostik mit dem Goldstandard, der IIF verglichen, fällt die schwache Übereinstimmung (Cohen's Kappa κ) auf und auch die tiefere Sensitivität, die nicht alle IIF-positiven Proben erfasst. Die Spezifität hingegen ist bei beiden Tests hoch. Welcher Test bei den CTD-Screen Assays richtig gemessen hat und warum noch so viele Proben nicht aufgedeckt wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Der wichtigste Punkt ist aber der Miteinbezug der Klinik. Denn ohne klinischen Verdacht auf eine AARE muss auch keine Diagnostik gemacht werden.

Das Ziel konnte erreicht werden, jedoch muss für die weitere Evaluation die Klinik miteinbezogen werden.

Referenzen

- [1] The International Consensus on ANA Patterns. (2023c). AC-2- Nukleär dicht fein gesprenkelt. https://anapatterns.org/view_pattern?pattern=2.php
- [2] Singh, D. P., Ohguro, N., Chylack, L. T., & Shinohara, T. (1999). Lens epithelium-derived growth factor: Increased resistance to thermal and oxidative stresses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(7), 1444–1451.
- [3] Conrad, K., Röber, N., Rudolph, S., & Mahler, M. (2014). DFS70-Antikörper – Biomarker zum Ausschluss ANA-assoziiierter rheumatischer Erkrankungen. *LaboratoriumsMedizin*, 38(6), 299–307. <https://doi.org/10.1515/labmed-2014-0042>
- [4] Infantino, M., Pregolato, F., Bentow, C., Mahler, M., Benucci, M., Li Gobbi, F., Damiani, A., Grossi, V., Franceschini, F., Bodio, C., Borghi, M. O., & Manfredi, M. (2019). Only monospecific anti-DFS70 antibodies aid in the exclusion of antinuclear antibody associated rheumatic diseases: An Italian experience. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57(11), 1764–1769. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0454>

Abbildungen

Titelbild: The International Consensus on ANA Patterns. (2023). AC-2- Nukleär dicht fein gesprenkelt. https://anapatterns.org/view_pattern?pattern=2.php
Abb. 1 Radulovic, M. (2023). Versuchsablauf. medi
Abb. 2 Nilius, H. (2023). Upset-Plot Phadia™ 250. Universitätsinstitut für klinische Chemie, Inselspital Bern
Abb. 3 Nilius, H. (2023). Upset-Plot BIO-FLASH®. Universitätsinstitut für klinische Chemie, Inselspital Bern