

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Automatisierte Bestimmung von Autoantikörpern mit indirekter
Immunfluoreszenztechnik: Eine komparative Analyse zweier
Automaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clemens Dario Loock

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Systemische Autoimmunerkrankungen.....	5
1.1.1 Kollagenosen.....	5
1.1.2 Systemische Vaskulitiden.....	8
1.2 Autoantikörper.....	11
1.2.1 Antinukleäre Antikörper (ANA).....	11
1.2.2 Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper.....	12
1.3 Methoden zum Nachweis von ANA und ANCA.....	13
1.3.1 Solid Phase Assays.....	14
1.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz.....	14
1.3.3 Automatisierte indirekte Immunfluoreszenz.....	15
1.4 Zielsetzung.....	16
2 Methodik	18
2.1 Patienten.....	18
2.1.1 ANA-Patientenkollektiv.....	18
2.1.2 ANCA-Patientenkollektiv.....	20
2.2 Methodik.....	21
2.2.1 Studienaufbau.....	21
2.2.2 Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztests.....	21
2.2.3 Bestimmung von ANA und ANCA mit visueller Fluoreszenzmikroskopie.....	22
2.2.3 Bestimmung von ANA mit Aklides®.....	23
2.2.4 Bestimmung von ANA und ANCA mit Helios®.....	25
2.3 Statistische Analysen.....	26
3 Ergebnisse	33

3.1 Ergebnisse ANA.....	33
3.1.1 visuelle Mikroskopie	33
3.1.2 Aklides®	37
3.1.3 Helios®	44
3.2. Ergebnisse ANCA	47
3.2.1 visuelle Mikroskopie	47
3.2.2 Helios®	47
3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
4 Diskussion	52
4.1 Methodik	53
4.1.1 Patienten	53
4.1.2 Methodik	54
4.2 Ergebnisse	56
4.2.1 ANA	56
4.2.2 ANCA.....	62
4.2.3 Limitationen der Studie.....	62
4.2.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
Literaturverzeichnis.....	66
Eidesstattliche Versicherung.....	78
Lebenslauf.....	79
Anteilerklärung an den eingereichten Publikationen	81
Danksagung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

AAK	Auto-Antikörper
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
ANCA	anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
AUC	Area under the Curve
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DK	Subgruppe Diagnosekriterium
EGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
HEp-2-Zellen	humane Epitheliumzellen Typ 2 einer Larynxkarzinomzelllinie
IASL	interdisziplinäres Autoimmunspeziallabor
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
κ	Cohens Kappa Koeffizient
KI	Konfidenzintervall
LE	Lupus erythematoses
LR	Likelihood Ratio (dt.: Wahrscheinlichkeitsverhältnis)
LR+	positive Likelihood Ratio
LR-	negative Likelihood Ratio
MCTD	Mixed connective tissue disease (dt: Mischkollagenose)
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MTA	medizinisch-technische/r Assistent/in
n	Anzahl der Patienten
n.b.	nicht berechenbar

NPW	negativer prädiktiver Wert
NRE	Subgruppe mit nicht bestätigter rheumatischer Erkrankung
PPW	positiver prädiktiver Wert
PR-3	Proteinase-3
RA	rheumatoide Arthritis
RI	Reaktivitätsindex
RE	Subgruppe mit bestätigter rheumatischer Erkrankung
ROC	Receiver Operating Characteristic
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
UCTD	Undifferentiated Connective Tissue Disease (dt: undifferenzierte Kollagenose)

Abstrakt

Einleitung: Als Routinemethode für das Screening von Kollagenosen und systemischen Vaskulitiden wird die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) zum Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) und anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) empfohlen. Die Methode benötigt allerdings Experten, sodass sie zeitaufwendig und subjektiv ist. Mit der Intention standardisierte, valide und kostengünstige IIF-Tests anbieten zu können, wurden automatisierte IIF-Prozessoren entwickelt. Vorläufige Untersuchungen dieser Automaten haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Ziel dieser Arbeit ist es, zwei dieser Automaten, Aklides[®] (Medipan GmbH) und Helios[®] (Aesku Diagnostics), bzgl. ihrer diagnostischen Reliabilität unter realistischen Arbeitsbedingungen im Labor zu untersuchen.

Methodik: In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von Patienten mit Verdacht auf systemische Autoimmunerkrankungen von zwei IIF-Automaten auf ANA überprüft (n = 1008). Weiterhin wurde mit Helios[®] in 145 Seren von Patienten mit Vaskulitis (n = 95) und gesunden Spendern (n = 50) ANCA bestimmt. Es wurde die Fähigkeit zur Positiv-Negativ-Diskrimination, der Modus der Mustererkennung sowie die Möglichkeit der Endtiterbestimmung evaluiert. Die Ergebnisse der zwei IIF-Prozessoren wurden mit den Ergebnissen des aktuellen Goldstandards, der visuellen Fluoreszenzmikroskopie verglichen.

Ergebnisse: Beide IIF-Automaten zeigten eine mäßige Übereinstimmung in der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA im Vergleich zur visuellen Fluoreszenzmikroskopie (Kappa-Werte: 0,494 für Aklides[®] und 0,415 für Helios[®]). Die Sensitivität/Spezifität betrug 89%/59% für Aklides[®] und 87%/54% für Helios[®]. Stark positive Seren (Titer $\geq 1:320$) mit hoher klinischer Relevanz wurden jedoch in 99% der Fälle korrekt klassifiziert. Aklides[®] identifizierte 43% der Fluoreszenzmuster korrekt und dessen Lichtintensitätswerte und die visuell bestimmten Titer korrelierten miteinander gut (Spearman Rho = 0,680). In der Bestimmung von ANCA bei den Vaskulitispatienten erreichte Helios[®] eine schwache Übereinstimmung (Kappa-Wert = 0,285) mit der visuellen IIF, bei einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 60%.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die automatisierte IIF-Bestimmung unter realistischen Arbeitsbedingungen weiterhin eine Herausforderung darstellt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität, besonders für klinisch relevante ANA-Titer, können IIF-Prozessoren bereits heutzutage eine hilfreiche Ergänzung im Labor darstellen. Die visuelle IIF können sie zurzeit aber nicht ablösen, da die Mustererkennung von ANA und die Positiv-Negativ-Diskrimination von ANCA nicht valide ist. Trotz guter Korrelation von

Lichtintensitäten und Titern, können Endtiter nicht definitiv vorhergesagt werden. Aktuelle Entwicklungen, wie die Erweiterung der IIF-Prozessoren um ANCA sowie die Verbesserung von Mustererkennung und Titerbestimmung werden der automatisierten IIF schrittweise den Weg in die Routinediagnostik ebnen.

Schlagwörter: antinukleäre Antikörper, anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper, indirekte Immunfluoreszenz, Automatisierung, rheumatische Autoimmunerkrankungen

Abstract

Introduction: Indirect immunofluorescence (IIF) assay for antinuclear antibodies (ANA) and antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is recommended as the routine method for screening of connective tissue diseases and systemic vasculitis. These assays require reading by experts, which is time-consuming and subjective. Automated IIF-processors have been developed to offer standardized, valid and cost-efficient IIF assays. Preliminary studies of these devices have shown promising results. The aim of this study is to determine the diagnostic reliability of two IIF-processors, Aklides[®] (Medipan GmbH) and Helios[®] (Aesku Diagnostics), under real laboratory working conditions.

Methods: ANA were determined in samples of patients with suspected autoimmune rheumatic disease (n = 1008) by two automated IIF-processors. Additionally, 145 serum samples of patients with systemic vasculitis (n = 95) and healthy donors (n = 50) were tested for ANCA by the Helios[®]. The processors' ability to discriminate positive from negative samples, the mode of pattern recognition and the possibility of predicting the end-point titer were evaluated. The results obtained from the two automated IIF-processors were compared with the results obtained by visual IIF, the current gold standard test.

Results: Both automated IIF-processors showed moderate agreement with visual IIF in discriminating positive from negative ANA samples (kappa values: 0.494 for Aklides[®], 0.415 for Helios[®]). The sensitivity/specificity was 89%/59% for Aklides[®] and 87%/54% for Helios[®]. However, definitely positive samples with a titer $\geq 1:320$ were classified correctly in 99% of the cases. Aklides[®] correctly identified 43% of fluorescence patterns and its light intensity values showed good correlation (Spearman's rho = 0.680) with visually obtained titers. For ANCA measurement in patients with systemic vasculitis, Helios[®] showed weak agreement (kappa value = 0.285) with visual IIF, a sensitivity of 82% and a specificity of 60%.

Conclusion: The results of this study show, that automated IIF determination under real laboratory working conditions remains a challenge. Due to their high sensitivity, especially at clinically-relevant ANA-titers, automated IIF-processors can already reliably reduce the workload in laboratories. At this stage, automated IIF cannot replace visual IIF, as ANA pattern recognition and positive/negative discrimination of ANCA is not valid. Despite good correlation of light intensity values and titer, end-point titers cannot be predicted reliably. Recent developments, such as the extension of IIF-processors for ANCA, improvements in pattern

recognition and end-point titer prediction, will prepare the way for automated IIF into routine diagnostics.

Keywords: antinuclear antibodies, antineutrophil cytoplasmic antibodies, indirect immunofluorescence, automation, autoimmune rheumatic diseases

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation „Automatisierte Bestimmung von Autoantikörpern mit indirekter Immunfluoreszenztechnik: Eine komparative Analyse zweier Automaten“ untersucht Reliabilität und Mehrwert bei der Verwendung von Automaten zum Screening auf antinukleäre Antikörper (ANA) und anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA). In der Einleitung wird im Wesentlichen auf Kollagenosen und Vaskulitiden als systemische Autoimmunerkrankungen, deren serologische Diagnostik anhand von Autoantikörpern (AAK) erfolgt, sowie die fortschreitende Automatisierung dieses Bereiches eingegangen. Dabei wird der aktuelle Forschungsstand des Automatisierungsprozesses miteinbezogen, aus dem sich die Zielsetzung und Notwendigkeit dieser Studie ergibt.

1.1 Systemische Autoimmunerkrankungen

Unter Autoimmunerkrankungen versteht man Erkrankungen, bei denen es zu einer überschießenden Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen kommt. Das Immunsystem erkennt dabei fälschlicherweise körpereigene Antigene als Fremdanigene, sodass eine spezifische adaptive Immunantwort ausgelöst wird, die Autoimmunerkrankungen zur Folge haben kann. Wenn sich die zugrunde liegenden Antikörper gegen Antigene richten, die in vielen verschiedenen Organen des Körpers vorkommen, handelt es sich um systemische Autoimmunerkrankungen [1].

Zu den systemischen Autoimmunerkrankungen gehören neben der rheumatoiden Arthritis und dem Antiphospholipid-Syndrom die Kollagenosen und systemischen Vaskulitiden. Bei Kollagenosen und systemischen Vaskulitiden handelt es sich um jeweils eine Gruppe von Erkrankungen. Ihnen gemein ist der oft uncharakteristische Beginn, wodurch eine endgültige Diagnose häufig erst im späteren Krankheitsverlauf gestellt werden kann. Charakteristisch sind allerdings erkrankungstypische Autoantikörper, die meist schon vor Beginn typischer klinischer Symptome nachweisbar sind. Da eine rechtzeitige Diagnose entscheidend für eine frühzeitige Therapie sein kann, kommt der Autoantikörperdiagnostik in der Früherkennung von Autoimmunerkrankungen eine besondere Bedeutung zu [2-4].

1.1.1 Kollagenosen

Bei den Kollagenosen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von chronisch-entzündlichen systemischen Autoimmunerkrankungen, die hauptsächlich das Bindegewebe, Blutgefäße und die quergestreifte Muskulatur betreffen können. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens dieser Strukturen kommt es regelmäßig zur Beteiligung innerer Organe. Bei diesen seltenen

Erkrankungen sind Frauen mittleren Alters bis zu 10-mal häufiger betroffen als Männer [5-8]. Zu den Kollagenosen zählen der systemische Lupus erythematoses, das Sjögren-Syndrom, die systemische Sklerose, idiopathische Myositiden, sowie Mischkollagenosen. Kennzeichnend für die Erkrankungen sind die spezifischen Autoantikörperprofile [9-14].

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine schubweise verlaufende Erkrankung unklarer Ätiologie, welche durch das Auftreten von ANA gekennzeichnet ist. Die Prävalenz beträgt 20-150/100.000, die Inzidenz 1-25/100.000, Frauen sind bis zu 10-mal häufiger betroffen als Männer [7, 15-18]. Unter den ANA haben Anti-dsDNA-Antikörper wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität sowie Anti-Sm-Antikörper aufgrund ihrer Spezifität eine eminent wichtige Rolle inne [13, 14]. Beim medikamenteninduzierten Lupus erythematoses kommen fast immer Anti-Histon-Antikörper vor [19]. Die Klinik dieser Erkrankung ist vielfältig und durch die Bildung von Immunkomplexen und deren Ablagerung in den verschiedenen Geweben bestimmt [20]. Das Spektrum des SLE umfasst milde bis letale Verläufe. Bei milden Verläufen stehen plötzlich auftretendes Fieber, Arthralgien, nicht destruierende Polyarthritiden sowie Hautläsionen, z.B. in Form des schmetterlingsförmigen Gesichtserythems im Vordergrund [21-23]. Komplikationen wie Pleuritis, Perikarditis, Myokardinfarkt, Vaskulitiden sowie Nephritiden sind hauptverantwortlich für die um das 3-fach gesteigerte Mortalität [24]. Die Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)-Gruppe hat 2012 neue Klassifikationskriterien für den Systemischen Lupus erythematoses (SLE) vorgeschlagen. Eine der wesentlichen Neuerungen gegenüber den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) besteht darin, dass die Diagnose des SLE ohne Nachweis von Autoantikörpern nicht mehr möglich ist [25].

Das Sjögren-Syndrom ist eine Kollagenose mit chronischer Entzündung exokriner Drüsen bisher unbekannter Ätiologie. Beim Sjögren-Syndrom handelt es sich um eine seltene Autoimmunerkrankung mit einer Inzidenz von 7/100.000 und einer Prävalenz von 43/100.000, die Mann zu Frau Ratio beträgt 1:9 [5].

Es wird unterteilt in ein primäres Sjögren-Syndrom und ein sekundäres Sjögren-Syndrom, welches im Sinne eines Overlap-Syndroms mit anderen Kollagenosen gemeinsam auftritt.

Die chronische Entzündung erzeugt ein Nachlassen der Drüsensekretion, die zum sogenannten Sicca-Syndrom mit Keratokonjunktivitis sicca, Xerostomie und Trockenheit anderer Schleimhäute führen kann. So können Symptome wie Heiserkeit, Hustenreiz, chronische Bronchitis und Sexualfunktionsstörungen den Patienten beeinträchtigen. Das Sjögren-Syndrom manifestiert sich bei ca. einem Drittel der Patienten extraglandulär, meist als nicht destruktive Arthritis, während

innere Organe selten betroffen sind. Auf Grundlage einer sekundären Vaskulitis können Polyneuropathie, Myositis und Purpura entstehen. Die vermehrte Mortalität lässt sich auf eine erhöhte Lymphominzidenz von 5% zurückführen [26].

Diagnostisch sollte das Sicca-Syndrom durch Schirmer- und Saxon-Test sowie bioptische Untersuchungen der Lippendrüsen objektiviert werden. Zahlreiche Autoantikörper kommen bei der Erkrankung vor. Die spezifischen Autoantikörper gegen Ro/SS-A und La/SS-B sind in den Klassifikationskriterien enthalten und bieten kombiniert eine gute Sensitivität und Spezifität [27].

Die systemische Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie, die sich durch mikrovaskuläre Veränderungen, Autoantikörperproduktion und übermäßige Kollagenproduktion manifestiert und letztlich zu Fibrose von Haut und inneren Organen führt. Sie lässt sich unterteilen in eine limitiert-kutane und eine diffus-kutane Form mit Tendenz zu schwerwiegenden Organbeteiligungen. Frauen sind bis zu 10-mal häufiger betroffen als Männer. Die Inzidenz beträgt ungefähr 5/100.000, die Prävalenz ca. 20/100.000 [6].

Bezeichnend für die limitiert-kutane Sklerose ist die Raynaud-Symptomatik, die sich oft als Frühsymptom zeigt. Andere typische Symptome der Haut sind die schmerzlosen Ödeme der Finger sowie auch Sklerodaktylie. Im Bereich des Gesichts imponieren sowohl Teleangiektasien als auch periorale Fältelung [28].

Bei systemischem Befall ist häufig eine nicht destruierende Polyarthrits sowie eine klinisch milde Myositis zu beobachten. Insbesondere Spätsymptome wie hypertensive Nierenkrise, Herzmanifestationen, pulmonale Hypertension und interstitielle Lungenerkrankung sind ursächlich für die erhöhte Mortalität [29].

Neben typischen dermatologischen Veränderungen und technischen Untersuchungen wie Röntgenaufnahme, Computertomografie und der Lungenfunktionsdiagnostik, spielt die serologische Bestimmung von AAK eine herausragende Rolle. Es besteht ein ausgeprägtes Autoantikörperprofil. ANA sind in ca. 95% der Patienten positiv, bereits in Frühphasen feststellbar und verschiedene AAK sind mit den klinischen Subtypen assoziiert. Während Anti-Centromer-Antikörper (ACA) auf die limitiert-kutane Verlaufsform schließen lassen, deuten Anti-Topoisomerase- (Scl-70) sowie Anti-RNA-Polymerase-Antikörper auf den prognostisch ungünstigen diffus-kutanen Typ hin [9-12].

Zu den idiopathischen Myositiden gehören die Polymyositis (PM) und die Dermatomyositis (DM). Sie sind seltene chronisch-entzündliche Erkrankungen der quergestreiften Muskulatur, die sich in erster Linie in symmetrischer, proximaler Schwäche der Becken- und Schultermuskulatur

äußern. Obwohl sich die beiden Erkrankungen in ihren prominentesten Symptomen sehr ähneln, unterscheiden sie sich in ihrem histomorphologischen Befund und in der Pathogenese. Die kombinierte Inzidenz von DM und PM beträgt 2/100.000, die Prävalenz 5-22/100.000. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer [8, 30-33].

Bei der DM treten zusätzlich Hauterscheinungen auf, die sich meist im Gesicht manifestieren [31]. Neben den Hauptsymptomen können das Raynaud-Syndrom, Ptosis, Dysphagie, Allgemeinreaktionen wie Fieber und Gewichtsverlust sowie Gelenkschmerzen bestehen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 63-75% und wird durch die Beteiligung innerer Organe wie auch den assoziierten Neoplasien verursacht [34].

Gesichert wird die Diagnose durch eine histologische Untersuchung der Biopsie. Trotzdem hat die serologische Untersuchung großes Gewicht. Ausschlaggebende Untersuchungen sind die Blutsenkungsgeschwindigkeit, die Serumelektrophorese, Muskelenzyme sowie die Antikörperbestimmung. Die myositisspezifischen Antikörper (MSA) besitzen eine hohe Spezifität und sind mit bestimmten klinischen Verlaufsformen assoziiert. Der häufigste MSA ist der Anti-Jo-1-Antikörper, der beim Anti-Synthetase-Antikörpersyndrom meist vorkommt und in den Klassifikationskriterien enthalten ist [35, 36]. Der Anti-Mi-2-Antikörper weist hingegen auf eine klassische Dermatomyositis hin [37]. Anti-SRP-Antikörper kommen fast ausschließlich bei Polymyositis vor und sind mit einer besonders schlechten Verlaufsform assoziiert [38, 39].

Die Mixed Connective Tissue Disease (MCTD) ist eine Mischkollagenose und gehört zu der Gruppe der Overlap-Syndrome. Die Prävalenz wird auf 4/100.000 und die Inzidenz auf 0,2/100.000 geschätzt. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer [40-42]. Bei der MCTD kommt es zum Auftreten von verschiedenen Symptomen des SLE, der PM und der systemischen Sklerose. Neben den klinischen Symptomen ist das Vorkommen von hohen Titern des Anti-U1-RNP-Antikörpers typisch und in den Klassifikationskriterien enthalten [43, 44].

Als Undifferentiated Connective Tissue Disease (UCTD) ist eine undifferenzierte Kollagenose definiert, die charakteristische Symptome von Kollagenosen und rheumatoider Arthritis enthält, ohne aber den Klassifikationskriterien einer definitiven, ausdifferenzierten Kollagenose zu entsprechen. Zu den Klassifikationskriterien der UCTD gehören eine mindestens drei Jahre andauernde charakteristische Klinik sowie positive ANA [45, 46].

1.1.2 Systemische Vaskulitiden

Systemische Vaskulitiden sind Erkrankungen, die durch Entzündungsprozesse in den Gefäßwänden sowie den damit einhergehenden Schädigungen der betroffenen Organe

charakterisiert werden. Man unterteilt sie in primäre Vaskulitiden unbekannter Ätiologie und sekundäre Vaskulitiden, deren Ursache Kollagenosen, Infektionskrankheiten oder Medikamente sein können [47].

Die meisten Patienten haben anfänglich eine ausgeprägte B-Symptomatik mit Adynamie, Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß, die sich in Blutbildveränderungen und erhöhten Entzündungsparametern widerspiegelt. Später unterscheiden sich die einzelnen Verläufe durch die Symptomatik der jeweils betroffenen Gefäße [47].

Gemäß den 2012 überarbeiteten Klassifikationskriterien der Chapel Hill Consensus Conference richtet sich die weitere Einteilung der Vaskulitiden nach der Größe der betroffenen Blutgefäße. Es gibt Vaskulitiden großer, mittlerer und kleiner Gefäße. Zu den Vaskulitiden kleiner Gefäße gehört die Gruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden, die die Granulomatose mit Polyangiitis, die mikroskopische Polyangiitis und die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis umfassen [48]. Aufgrund der Relevanz für die durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit wird ausschließlich auf die Gruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden eingegangen.

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher Wegener-Granulomatose) verursacht typischerweise eine granulomatöse Entzündung der oberen und unteren Atemwege sowie eine nekrotisierende Glomerulonephritis. Die Prävalenz beträgt 2-16/100.000, die Inzidenz 0,3-1,4/100.000, beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen [49].

Zusätzlich zur B-Symptomatik sind Husten, Rhinosinusitis mit Sattelnase und Dyspnoe charakteristische Symptome der Initialphase [50-52]. In der Generalisationsphase können innere Organe, ZNS und Bewegungsapparat mitbetroffen sein, wobei sowohl pulmonale Fibrose und Hypertonie als auch die rapid-progressive Glomerulonephritis hervorzuheben sind [50, 53]. Diese sind maßgeblich für die erhöhte Mortalität verantwortlich, sodass die die 5-Jahres-Überlebensrate trotz erheblicher Verbesserungen bei 75% liegt [54].

Für die Diagnostik sind klinische, immunologische und histopathologische Untersuchungen relevant. Bei aktiver, generalisierter Erkrankung sind ca. 90% der Patienten ANCA positiv. Von den ANCA positiven Patienten haben 80-90% c-ANCA, wohingegen die restlichen Patienten p-ANCA positiv sind. Die Sensitivität von c-ANCA ist von Ausmaß, Schwere und Aktivität der Erkrankung abhängig [55].

Die mikroskopische Polyangiitis (MPA, früher mikroskopische Panarteriitis nodosa) befällt obligat kleine und fakultativ auch größere Gefäße. Mit Beteiligung von Atemwegen und Glomerulonephritis ähnelt ihr klinisches Bild dem der GPA. Histologisch unterscheidet sich die MPA jedoch durch das Fehlen von Granulomen. Die Prävalenz beträgt 1-10/100.000, die

Inzidenz 0,1-1/100.000, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 60-70 Jahren, während das Geschlechterverhältnis ausgeglichen erscheint [56]. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird in der Literatur auf 45%-75% geschätzt [54].

Die Unterscheidung von GPA und MPA ist dahingehend wichtig, weil GPA eine höhere Rezidivrate aufweist [57]. Wie auch bei der GPA sind klinische, immunologische und histopathologische Untersuchungen wegweisend für die Diagnose der MPA, wobei der serologischen Diagnostik eine besondere Bedeutung zukommt. Ungefähr 70% der Patienten mit MPA sind ANCA positiv. Im Gegensatz zu GPA handelt es sich meist um p-ANCA, wohingegen nur ein kleiner Teil c-ANCA positiv ist. ANCA sind außerdem sehr hilfreich, um die MPA von der Polyarteriitis nodosa abzugrenzen, da sie nicht mit ANCA assoziiert ist [55, 58].

Die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, früher Churg-Strauss-Syndrom) ist eine multisystemische Erkrankung, die durch allergische Rhinitis, Asthma und Eosinophilie im Serum gekennzeichnet ist und hauptsächlich kleine und mittlere Gefäße betrifft [59-63].

Die genaue Epidemiologie ist bisher ungeklärt. Unterschiedliche Daten legen eine Prävalenz von ca. 2/100.000, ein Durchschnittsalter bei Diagnose von 40 Jahren und eine ausgeglichene bis leicht weiblich gewichtete Geschlechterverteilung nahe [64-67]. Im weiteren Verlauf können alle Organe betroffen sein. Häufig kommt es zu neurologischen Störungen, für die 5-Jahres-Überlebensrate von 68%-100% sind jedoch hauptsächlich respiratorische und kardiale Insuffizienzen verantwortlich [54].

Die Diagnostik basiert auf klinischen Symptomen, serologischen Befunden und der Bildgebung. In Patienten mit EGPA wurden sowohl c-ANCA als auch p-ANCA mit unterschiedlichen Häufigkeiten festgestellt. Insgesamt sind ca. 50% der Patienten ANCA-positiv mit einem Überwiegen von p-ANCA und Patienten mit aktiver, unbehandelter Erkrankung [61, 68-72]. Einige Studien geben Hinweise darauf, dass ANCA-positive Patienten eher Glomerulonephritis, alveoläre Blutungen und neurologische Störungen entwickeln, während ANCA-negative Patienten von pulmonaler und kardialer Beteiligung betroffen sind [69, 73].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei Kollagenosen und Vaskulitiden um systemische Autoimmunerkrankungen handelt, die eine erhebliche Einschränkung von Lebenserwartung und -qualität von Betroffenen verursachen. Die Kombination aus geringer Inzidenz und unspezifischen Erstsymptomen kann eine korrekte Diagnose wesentlich verzögern. Da die Autoantikörper ANA und ANCA ein hilfreiches und notwendiges Mittel zu ihrer Diagnose sind, wird im nächsten Abschnitt auf sie eingegangen.

1.2 Autoantikörper

Autoantikörper sind eine heterogene Gruppe an Immunglobulinen, die sich gegen körpereigene Antigene richten. Ziel dieser Reaktionen können Proteine, Nukleinsäuren, Phospho- und Glykosphingolipide sein. Ungeachtet ihrer Rolle in der Pathogenese besitzen sie eine große diagnostische Relevanz [47].

Da ANA und ANCA eine Schlüsselrolle in der Vorhersage, Diagnose und Aktivitätsbestimmung systemischer Autoimmunerkrankungen einnehmen, werden sie im Folgenden näher dargestellt [74].

1.2.1 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Bei ANA handelt es sich um einen Sammelbegriff für eine große, heterogene Gruppe von zirkulierenden Autoantikörpern, die sich gegen die Komponenten des Zellkerns richten. Man versteht sie auch als Antikörper, die im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) ein nukleäres Muster erzeugen, ihre Konzentration wird in Titern gemessen [47]. Sie sind ein charakteristisches Merkmal von systemischen Autoimmunerkrankungen wie Kollagenosen [3].

Um die richtige Interpretation bei positiven ANA-Befunden zu gewährleisten, werden üblicherweise sowohl das Fluoreszenzmuster als auch der Titer des untersuchten Serums von klinischen Laboren angegeben. Die Fluoreszenzmuster weisen auf bestimmte AAK hin, die wiederum mit gewissen Erkrankungen assoziiert oder sogar spezifisch für diese sind. Der Zusammenhang zwischen den wichtigsten Fluoreszenzmustern, assoziierten Zielantigenen und möglichen Autoimmunerkrankungen ist in Abb. 1 dargestellt.

Ob ein Serum ANA-positiv bewertet wird, hängt von dem Titer sowie dem Referenzbereich des entsprechenden Labors ab, wobei das Vorhandensein von hohen ANA-Titern typisch für Kollagenosen ist [3]. Für ds-DNA-AK konnte gezeigt werden, dass sie auch mit dem Aktivitätsgrad der Erkrankung korrelieren und dadurch Schübe und Therapieansprechen objektiviert werden können [12, 75].

Für die Messung von ANA hat sich ein zweistufiger Ansatz mit einem Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) und einem Bestätigungstest anhand ELISA etabliert. Darauf wird im Kapitel „1.3 Methoden zum Nachweis von ANA und ANCA“ eingegangen.

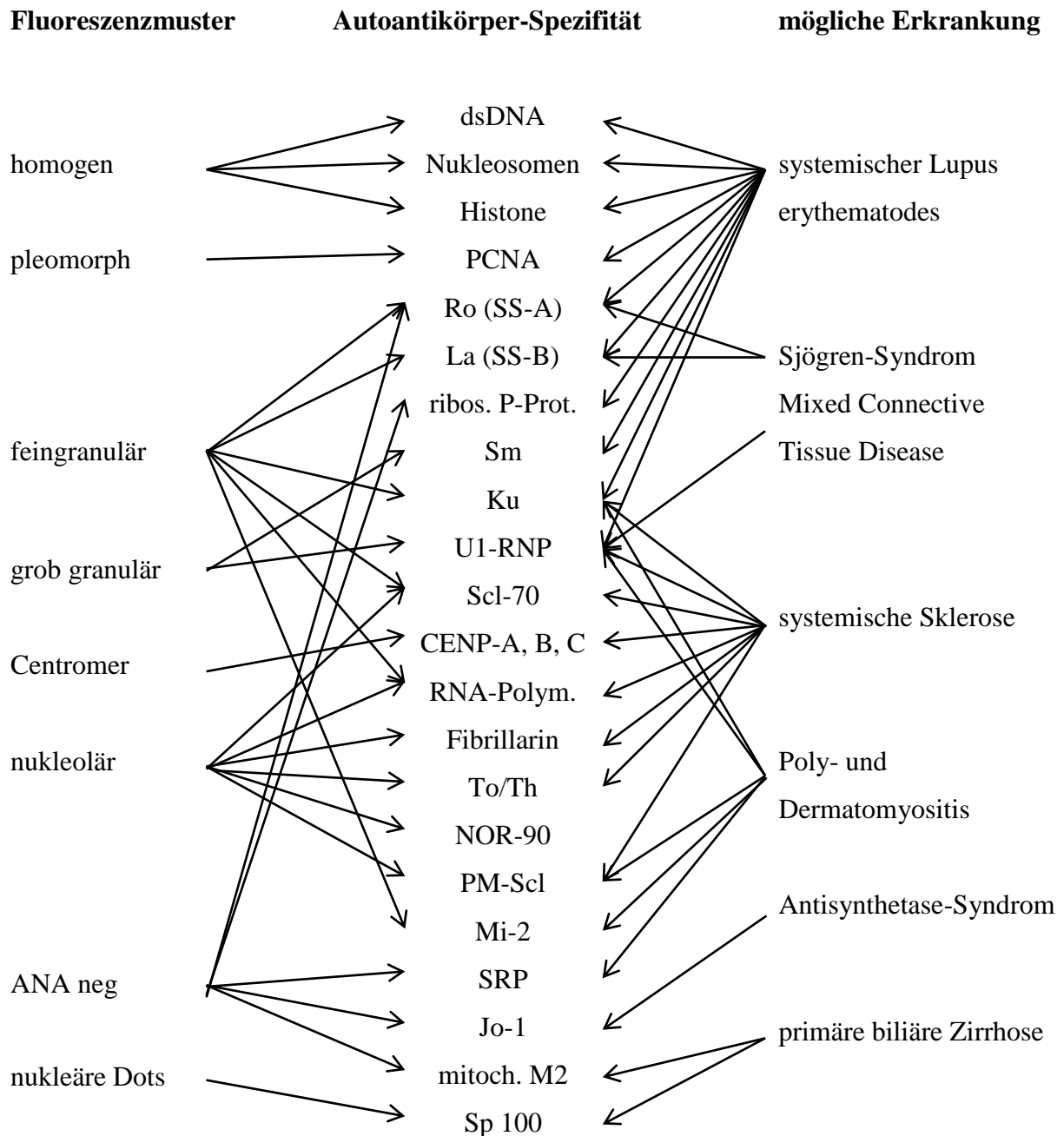


Abb. 1: Fluoreszenzmuster, Antikörperspezifitäten und mögliche Erkrankungen, adaptiert nach Sack [76]

1.2.2 Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper

Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) ist eine Sammelbezeichnung für alle AAK, die sich gegen cytoplasmatische Antigene neutrophiler Granulozyten richten und im IIFT typische Fluoreszenzmuster bilden.

Zu ihnen gehören c-ANCA, p-ANCA und a-ANCA. Aufgrund ihrer hohen klinischen Relevanz wird im Folgenden nur auf c-ANCA und p-ANCA eingegangen. Sie lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzen unterscheiden: c-ANCA ergeben in Ethanol-fixierten Granulozyten granulär cytoplasmatische Muster und p-ANCA ergeben perinukleäre Muster in

Formalin-fixierten Granulozyten. Mit Hilfe dieser Muster kann man auf die Zielantigene schließen und sie mit ELISA nachweisen.

c-ANCA richten sich gegen die Proteinase 3 (PR3), p-ANCA hauptsächlich gegen die Myeloperoxidase (MPO). Elastase, Kathepsin G, Azurozidin, Laktoferrin und Lysozym stellen weitere Zielantigene von p-ANCA dar [47].

Ihre hohe klinische Relevanz spiegelt sich in der Namensgebung der ANCA-assoziierten Vaskulitiden wider. ANCA-positiv sind insgesamt mehr als 90% der Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), 70% mit mikroskopischer Polyangiitis (MPA) und 50% mit eosinophiler granulomatöser Polyangiitis (EGPA) [55, 58, 68].

Für die GPA sind c-ANCA/PR3-ANCA hochspezifisch, während sich ihre Sensitivität nach der Krankheitsaktivität richtet. Daher sind sie sowohl für das Screening, als auch das Therapiemonitoring der GPA wertvoll. Bei der Diagnose der MPA und der EGPA spielen sie eine untergeordnete Rolle [55].

Bei der Diagnose der MPA haben p-ANCA/MPO-ANCA aufgrund ihrer hohen Spezifität einen hohen Stellenwert, wohingegen sie für GPA und EGPA weniger relevant sind [58]. Übersichtlich ist der Zusammenhang in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Zusammenhang von Fluoreszenzmuster, Zielantigen und systemischer Vaskulitis bei ANCA, nach Conrad [47]

Muster	Hauptzielantigen	systemische Vaskulitis
c-ANCA	Proteinase 3 (PR3)	GPA (sehr hohe Spezifität) MPA (geringe Spezifität) EGPA (geringe Spezifität)
p-ANCA	Myeloperoxidase (MPO)	GPA (geringe Spezifität) MPA (hohe Spezifität) EGPA (geringe Spezifität)

1.3 Methoden zum Nachweis von ANA und ANCA

Für die Bestimmung von ANA und ANCA wurde eine Vielzahl von Tests entwickelt. Um AAK nachzuweisen, wurden in der Vergangenheit sowohl Immunassays als auch die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) mit unterschiedlichen Substraten verwendet. Diese Techniken wurden weitgehend durch die IIF unter Verwendung einer humanen Tumorzelllinie für ANA und alkohol-fixierten humanen Neutrophilen für ANCA sowie durch ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) ersetzt. Um optimale Ergebnisse zu erzielen hat sich ein zweistufiger

Ansatz etabliert. Wegen der hohen Sensitivität wird die IIF als Screeningtest und ELISA aufgrund seiner hohen Spezifität als Bestätigungstest verwendet [12].

In diesem Abschnitt wird hauptsächlich auf die indirekte Immunfluoreszenz eingegangen. Damit ihre Einordnung im zweistufigen Ansatz verständlich wird, steht ihr ein kurzgefasster Überblick der Enzymimmunoassays voran.

1.3.1 Solid Phase Assays

Zur Bestimmung von AAK wurden unterschiedliche Solid Phase Assays eingeführt. Dazu gehören ELISA, Fluorescent Microsphere Assays und Immunoline Assays. Diese Verfahren nutzen native oder rekombinante Antigene, um AAK zu binden und nachzuweisen. Aktuell wird ELISA als Bestätigungstest für ANA und ANCA genutzt, die im IIFT positiv bewertet wurden. Dabei wird sich ihre Eigenschaft zu Nutze gemacht, spezifisch die konkreten AAK zu bestimmen. Da diese Methode automatisierbar und dadurch effizient einzusetzen ist, wurde zeitweise versucht, sie auch als Screeningtest zu etablieren. Mangelnde Sensitivität und ein geringerer Umfang an nachweisbaren AAK führte allerdings zu Empfehlungen die IIF als Goldstandard für das Screening auf ANA und ANCA zu verwenden [77-80].

1.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist das am weitesten verbreitete diagnostische Verfahren zum Nachweis von ANA und ANCA. Dabei reagieren in einem ersten Schritt AAK eines verdünnten Patientenserums mit Antigenen eines Substrats. Als Substrat für das Screening auf ANA mit IIF sind humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms (HEp-2-Zellen) weitestgehend etabliert [2, 3]. Für das ANCA-Screening werden Ethanol-fixierte, humane Granulozyten verwendet. Zur Differenzierung von ANA und p-ANCA werden Formalin-fixierte Granulozyten genutzt [80]. Diese Zellen werden in Monolayern auf Objektträgern gezüchtet und sind folglich dort fixiert. In einem zweiten Schritt binden Fluoreszein-markierte anti-humane Antikörper an den humanen AAK. Dadurch entsteht ein typisches Fluoreszenzmuster, welches mit einem Fluoreszenzmikroskop von einem Experten bewertet wird. Die Muster liefern Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden AAK. Liegt ein positives Ergebnis vor, wird das Serum weiter verdünnt und erneut getestet, bis ein Endtiter bestimmt werden kann [76].

Aufgrund wesentlicher Vorteile ist die visuelle indirekte Immunfluoreszenz die Referenztechnik für das Screening von ANA und ANCA bei Verdacht auf systemische Autoimmunerkrankungen [3]. Ein fundamentaler Vorzug dieser Methode ist der große Umfang an AAK, die gleichzeitig entdeckt werden können [74]. Des Weiteren ist die IIF aufgrund ihrer hohen Sensitivität im besonderen Maße für das Screening auf AAK geeignet [77]. Ein weiterer Vorteil ist die

gleichzeitige Bestimmung von Fluoreszenzmustern und Titern innerhalb eines Tests. Diese positiven Eigenschaften, wie auch insbesondere die Überlegenheit gegenüber ELISA im Bezug auf die Sensitivität, führten zu einer Bestätigung des American College of Rheumatology der IIF als Goldstandard zum Screening für ANA [77].

Dennoch haften der IIF einige gravierende Nachteile an. So müssen die Muster visuell durch einen Experten bestimmt werden, dessen Fähigkeit, die spezifischen Fluoreszenzen und Titer korrekt zu bestimmen aber von seiner Qualifikation und Erfahrung abhängt. Besonders in kleineren, nicht spezialisierten Laboren kann dies ein diagnostisches Problem darstellen [76, 81]. Dadurch handelt es sich um ein subjektives Verfahren, was zu einer erhöhten Inter- und Intravariabilität von Laboren führen kann. Dieser Mangel an Reproduzierbarkeit lässt sich unter anderem durch einen geringen Grad an Standardisierung und Automatisierung der IIF erklären. In Konsequenz handelt es sich um eine arbeitsintensive, zeitaufwendige und kosteneffiziente Methode [82].

Diese Nachteile aufgreifend und dem wachsenden Bedarf von ANA- und ANCA-Bestimmungen Rechnung tragend, hat sich die biomedizinische Industrie das Ziel gesetzt, technische Lösungen zu finden. Auf den aktuellen Stand der Automatisierung wird daher im nächsten Kapitel eingegangen [83].

1.3.3 Automatisierte indirekte Immunfluoreszenz

Mit der Absicht die Nachteile der visuellen IIF zu überwinden, wurden innerhalb der letzten Jahre Automaten mit intelligenter Musterbestimmung für ANA und ANCA entwickelt [76, 81, 84]. Diese technische Erneuerung fußt auf dem Prinzip der Digitalisierung und der computerassistierten Auswertung von Fluoreszenzmustern. Die Prozessoren nutzen dabei vollautomatisierte Objektive, Mikroskope und hochauflösende Kameras sowie algorithmenbasierte Bilderkennungssoftware [82, 84].

Primäres Ziel dieser Entwicklung ist es, die Standardisierung und Automatisierung der IIF voranzutreiben, da sie im Vergleich zu anderen Bereichen der Labordiagnostik noch erheblichen Aufholbedarf hat. Dadurch soll die Methode weiterhin objektiviert und die Variabilität der Ergebnisse gesenkt werden. Außerdem sollen die IIF-Prozessoren eine technische Lösung bieten, um der gewachsenen Nachfrage nach IIFs gerecht zu werden [82]. Der Bedarf an IIFs hat sich innerhalb der letzten 15 Jahre deutlich gesteigert, was vor allem auf das gewachsene Verständnis für die Pathogenese und diagnostische Rolle von AAK in systemischen Autoimmunerkrankungen zurückzuführen ist [74, 83]. Zusätzlich sorgen Budgetlimitationen für

Zusammenlegungen von Laboren, die letztendlich eine große Anzahl von IIFTs erbringen müssen [85]. Im Rahmen dieser Entwicklung wurde eine Reihe von verschiedenen kommerziell verfügbaren Prozessoren entwickelt, die sich in ihren Fähigkeiten der Testvorbereitung und -durchführung unterscheiden. Gemeinsam ist den Automaten ihre Hauptaufgabe: die Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA mittels IIFT. Unterschiede bestehen im Grad der Automatisierung, der Fähigkeit zur Testvorbereitung, der ANA-Mustererkennung, der Endtitervorhersage und der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANCA. Bisher gibt es 6 Geräte, zu denen Veröffentlichungen erschienen sind: Aklides[®] (Medipan GmbH), EuroPattern[®] (Euroimmun AG), Helios[®] (Aesku Diagnostics), Image Navigator[®] (Immuno Concepts), Nova View[®] (Inova Diagnostics) und Zenit G-Sight[®] (Menarini Diagnostics) [82-91].

Insgesamt ergaben diese Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse und zeichneten ein sehr positives Bild der automatisierten Bestimmung von ANA und ANCA. Besonders bezogen auf die Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA wurden hohe Werte für die Übereinstimmung mit der visuellen Methode beschrieben. Die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten ließen die Autoren schlussfolgern, dass es sich um geeignete Screeningmethoden für ANA und ANCA handelt. Für die Abschätzung des Endtiters anhand der Lichtintensitäten der Fluoreszenzmuster wurden gute Korrelationen gefunden, ohne dass jedoch konkrete Titer vorhergesagt werden konnten. Die Ergebnisse der Mustererkennung waren teilweise unbefriedigend und legten nahe, dass weitere Verbesserungen in diesem Bereich notwendig sind. Die meisten dieser Studien bezogen sich jedoch auf einzelne Automaten und hatten unterschiedliche Studienansätze und naturgemäß andere Patientenkollektive. In diesem Zusammenhang sind die Studien von Bizzaro et al. und Tozzoli et al. hervorzuheben, die einen Überblick bieten und einen komparativen Ansatz verfolgen [82, 83]. In der Studie von Bizzaro et al. wird das gleiche Patientenkollektiv von allen Automaten untersucht [82]. Wie in den anderen Studien auch wird das untersuchte Patientenkollektiv von gut definierten, präselektierten Patienten dominiert, deren Seren hinsichtlich Eindeutigkeit bzgl. Positivität, Muster und Titer ausgesucht wurden. So wurden die Untersuchungen nicht unter Routinebedingungen eines Autoimmunlabors durchgeführt, bei der die Diagnose des Patienten oft unbekannt ist.

1.4 Zielsetzung

Aktueller Forschungsstand: Kollagenosen und Vaskulitiden sind systemische Autoimmunerkrankungen, deren Diagnose durch ihre relativ geringe Inzidenz und unspezifischen Erstmanifestationen erheblich erschwert wird. Dadurch wird eine frühzeitige Diagnose und Therapie teilweise jahrelang verzögert. AAK wie ANA und ANCA als

Phänomene dieser Erkrankungen sind von wesentlicher Bedeutung für ihre serologische Diagnostik.

Als Screeningmethode für ANA und ANCA ist die IIF seit Jahrzehnten etabliert und wurde als Goldstandard bestätigt. Dennoch haften der visuellen IIF einige Nachteile an, die im Wesentlichen auf der Abhängigkeit von Experten beruhen. Diese erzeugt Variabilität, ist arbeitsintensiv und steht so der weiteren Standardisierung der Methode im Weg.

In letzter Zeit hat die biomedizinische Industrie technische Lösungen in Form von Automaten entwickelt, die den Anforderungen moderner Labore an die IIF gerecht werden könnten. Erste Studien mit präselektierten Patientenkollektiven unter kontrollierten Bedingungen ergaben vielversprechende Ergebnisse für diese Automaten.

Fragestellung: Die Absicht der vorliegenden Arbeit liegt in der Klärung der Frage, ob die automatisierte Beurteilung der IIF der bisher üblichen visuellen Methode gegenüber gleichwertig ist. Dazu wurden ANA und ANCA Bestimmungen durchgeführt.

Primäre Fragestellung: Wie reliabel sind die IIF-Prozessoren Aklides[®] und Helios[®] bei der ANA-Bestimmung unter realen Arbeitsbedingungen der Routinediagnostik?

Sekundäre Fragestellung: Wie reliabel ist Helios[®] bei der ANCA-Bestimmung? Da dazu noch wenig publiziert wurde, erfolgte die Untersuchung anhand eines gut definierten Kollektivs.

Zielsetzung: Um dies zu überprüfen, wurde mit den IIF-Prozessoren Aklides[®] und Helios[®] ein Patientenkollektiv aus der Routinediagnostik hinsichtlich ANA und ein präselektiertes Patientenkollektiv hinsichtlich ANCA mit Helios[®] untersucht. Diese Messungen wurden mit den Ergebnissen visueller IIF verglichen und analysiert. Konkret wurden dafür

- I) die Interrater-Reliabilität beider Automaten bzgl. der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA mit der visuellen IIF,
- IIa) die Mustererkennung und
- IIb) die Korrelation von Titern und Lichtintensitäten bei Aklides[®],
- III) die Interrater-Reliabilität von Helios[®] bzgl. der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANCA mit der visuellen IIF bestimmt und evaluiert.

2 Methodik

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt Serumproben von 1008 konsekutiven Patienten mit Verdacht auf systemische rheumatische Erkrankungen bzgl. ANA und 95 Patienten mit einer Vaskulitis hinsichtlich ANCA untersucht. Als Kontrollgruppe für die Vaskulitispatienten wurden Seren von 50 Blutspendern verwendet. Die auf ANA getesteten Seren wurden dem interdisziplinären Autoimmunspeziallabor (IASL) der Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zugesandt. Die Seren der Vaskulitispatienten entstammten einem Forschungskollektiv mit gesicherter Diagnose. Ihre Positivität für PR3-ANCA bzw. MPO-ANCA wurde mit Hilfe von ELISA festgestellt. Für diese Untersuchungen liegt ein Votum der Ethikkommission der Charité vor (EA/193/10).

2.1.1 ANA-Patientenkollektiv

Gesamtes Patientenkollektiv:

In dem Patientenkollektiv von 1008 Patienten waren 388 (38%) männlich und 620 (62%) weiblich. Das durchschnittliche Alter betrug 50,2 Jahre (\pm 19,5), wobei der älteste Patient 91 Jahre und der jüngste Patient 1 Jahr alt waren. Die Einsender der Seren waren regionale Krankenhäuser, wobei die Kliniken der Charité den größten Anteil stellten.

Stichprobe und deren Einteilung in Subgruppen:

Endgültige Diagnosen werden dem Labor normalerweise nicht mitgeteilt. Um den Zusammenhang zwischen den Messergebnissen und Diagnosen rheumatischer Erkrankungen analysieren zu können, wurden die Diagnosen einer Stichprobe der ursprünglichen 1008 Patienten ermittelt. Um Diagnosesicherheit gewährleisten zu können, war hierbei Einschlusskriterium, dass die Diagnose an der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie/Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Charité Mitte erfolgte. Dies war bei 118 Patienten gegeben.

Von den 118 Patienten dieser Gruppe waren 34 (29%) männlich und 84 (71%) weiblich. Das durchschnittliche Alter betrug 51,1 Jahre (\pm 14,9). Der jüngste Patient war 15 Jahre alt, der älteste 87 Jahre.

Da es sich bei ANA um ein Phänomen rheumatischer Erkrankungen handelt, wurden diese 118 Patienten in Subgruppen hinsichtlich ihrer Diagnose in bestätigte rheumatische Erkrankung (RE) und nicht bestätigte rheumatische Erkrankung (NRE) eingeteilt [84, 92, 93]. Patienten, deren Diagnose ANA als Diagnose- bzw. Klassifikationskriterium enthielt, wurden zusätzlich der

Subgruppe Diagnosekriterium (DK) zugeteilt [27, 44, 46, 94-96]. Die Subgruppe DK ist somit Teilmenge von RE.

In der Gruppe der rheumatisch Erkrankten waren 29 (29%) Patienten männlich und 70 (71%) weiblich. Durchschnittlich waren die Patienten 52,0 Jahre ($\pm 15,2$) alt. Das minimale Alter lag bei 15, das maximale bei 87 Jahren. Von den 12 Patienten der Diagnosekriteriumsgruppe waren alle 12 (100%) weiblich. Das durchschnittliche Alter lag bei 49,9 ($\pm 13,3$) Jahren, wobei die jüngste Patientin 33 und die älteste Patientin 77 Jahre alt waren.

Bei den nicht rheumatisch Erkrankten waren 14 (74%) Patienten weiblich und 5 (26%) männlich. Das Durchschnittsalter betrug 46, 2 ($\pm 12,5$). Das Altersspektrum umfasste 25 bis 65 Jahre.

Diagnosen

Von den 118 Patienten hatten 99 Patienten Diagnosen aus dem rheumatischen Formenkreis, bei 19 Patienten wurde keine rheumatische Erkrankung festgestellt. Bei 12 der 99 rheumatisch Erkrankten waren ANA Diagnose- bzw. Klassifikationskriterium. Daraus ergab sich, dass 84% der Patienten der Gruppe RE, 16% der Gruppe NRE und 10% der Gruppe DK zugeordnet wurden.

Eine detaillierte Darstellung dieser Einteilung sowie Vorkommen und Verteilung der Diagnosen findet sich in Tab. 2. Die mit Abstand häufigste Diagnose war die rheumatoide Arthritis mit 50 Fällen. Diagnosen, die öfter als fünf Mal vorkamen waren Polymyalgia rheumatica, Psoriasisarthritis, Spondyloarthritis und die systemische Sklerose. Die Diagnosen, bei denen ANA Diagnose- bzw. Klassifikationskriterium darstellt waren die MCTD, das Sjögren-Syndrom, die systemische Sklerose sowie die undifferenzierte Kollagenose.

Tab. 2: Vorkommen und Verteilung rheumatischer Diagnosen der Subgruppe

Rheumatische Erkrankung	Diagnosen	Diagnosekriterium	Anzahl	Prozent
	gesamt		118	100%
RE	Antiphospholidpid-Syndrom		1	< 1%
	Gichtarthritis		1	< 1%
	Granulomatose mit Polyangiitis		2	2%
	MCTD	DK	1	< 1%
	Polyarthrose		3	3%
	Polychondritis		1	< 1%
	Polymyalgia rheumatica		6	5%
	Psoriasisarthritis		10	8%
	Raynaud-Syndrom		2	2%
	Rheumatoide Arthritis		50	42%
	Riesenzellarteriitis		1	< 1%
	SAPHO-Syndrom		1	< 1%
	Sjögren-Syndrom	DK	1	< 1%
	Spondyloarthritis		9	8%
systemische Sklerose	DK	7	6%	
undifferenzierte Kollagenose	DK	3	3%	
NRE	ohne Diagnose aus rheum. Formenkreis		19	16%

2.1.2 ANCA-Patientenkollektiv

Von den 95 durch ELISA (Orgentec Diagnostika, Mainz, Deutschland) präselektierten Vaskulitispatienten waren 43 (45%) männlich und 52 (55%) weiblich. Das durchschnittliche Alter betrug 55,9 (\pm 18,2 Jahre), wobei der jüngste Patient 15 Jahre alt und der älteste Patient 82 Jahre alt war.

Kontrollgruppe:

Als Kontrollgruppe wurden 50 Blutspender herangezogen, bei denen es sich um 35 männliche und 15 weibliche Personen handelte. Die Kontrollgruppe hatte ein durchschnittliches Alter von 34,9 Jahren (\pm 11,9), mit einem Altersspektrum von 18 bis 62 Jahren.

2.2 Methodik

2.2.1 Studienaufbau

In der Studie wurden die Seren von 1008 Patienten anhand von visueller Mikroskopie, des Halbautomaten Aklides[®] (Medipan GmbH, Dahlewitz, Deutschland) und des Vollautomaten Helios[®] (Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Deutschland) auf ANA untersucht. Außerdem wurden die Seren von 95 Vaskulitispatienten und 50 Blutspendern mittels visueller Mikroskopie und dem Vollautomaten Helios[®] auf ANCA getestet. Anschließend wurden die Ergebnisse der Automaten analysiert und mit denen der visuellen Mikroskopie, dem aktuellen Goldstandard verglichen.

2.2.2 Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztests

Für die routinemäßige Bestimmung von ANA, hat sich im Allgemeinen der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) an HEp-2-Zellen etabliert. HEp-2-Zellen sind humane Epitheliumzellen Typ 2 einer Larynxkarzinomzellreihe, welche die klinisch signifikanten Antigene aufweisen. Auf diese Weise kann sowohl der Titer, als auch das Fluoreszenzmuster bestimmt werden. Anhand des Fluoreszenzmusters können die ANA differenziert und auf die spezifischen Antikörper geschlossen werden [3, 92].

Der indirekte Immunfluoreszenztest erfolgt in mehreren Schritten: Das Patientenserum wird mit einem im Testkit bereitgestellten Phosphatpuffer verdünnt und dem Monolayer aus HEp-2-Zellen hinzugegeben. Im ersten Inkubationsschritt binden die Antikörper des verdünnten Patientensersums an Antigene der HEp-2-Zellen, mit denen ein Objektträger beschichtet ist. Es folgt eine 30-minütige Inkubationszeit, nach der die ungebundenen Serumbestandteile mit Phosphatpuffer in einem zehnminütigen Vorgang ausgewaschen werden. In einem zweiten 30-minütigen Inkubationsschritt reagieren die gebundenen Antikörper mit dem im Konjugat befindlichen antihumanen AK. Diese AK sind durch den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert. Es schließt sich ein weiterer Waschvorgang an. Zum Abschluss des Tests werden die Objektträger mit einem glycerinhaltigem Mountingmedium fixiert. Die markierten Antigen-Antikörper-Komplexe können dann mit einem Fluoreszenzmikroskop als spezifische Muster detektiert und den entsprechenden Antikörpern zugeordnet werden. Gleichzeitig findet die Bestimmung des Titers statt [76].

Der Referenzbereich des IASL ist ein Titer $< 1:160$. Demnach wurden Seren mit ANA-Titer $\geq 1:160$ als positiv und $< 1:160$ als negativ definiert. Dieser negative Cut-off-Titer wird von einer multizentrischen Studie empfohlen, um die Unterscheidung zwischen klinisch relevanten ANA

und ANA bei Gesunden zu verbessern. Dort wurde festgestellt, dass bei kleineren Titern eine erheblich größere Anzahl an Gesunden ANA positiv ist: 32% bei 1:40, 13% bei 1:80 und 5% bei 1:160 [97]. Dennoch besteht die Notwendigkeit, dass jedes Labor den Cut-off-Titer selbst festlegt, da Titer von den benutzten Reagenzien und Equipment beeinflusst werden können. Hierbei sollte ein Titer gewählt werden, bei dem weniger als 5% der Gesunden ANA positiv sind [97-99]. Cytoplasmatische Muster wurden als negativ bewertet. Da in den meisten Fällen gemischte Muster vorlagen, wurden diese zusammengefasst. Die Seren wurden dabei dem jeweiligen dominanten Muster, also dem Muster, welches bei höchster Titerstufe noch positiv war, zugeordnet. Die dicht feingranulären und feingranulären Muster wurden gemäß internationalem Konsensus zu feingranulären Mustern zusammengefasst [100].

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen bei ANA steht das Vorgehen bei der Diagnostik der ANCA mittels IIF. Anstatt der HEp-2-Zellen kommen Ethanol- bzw. Formalin-fixierte humane neutrophile Granulozyten zur Anwendung. Da ANA und MPO-ANCA auf Ethanol-fixierten humanen neutrophilen Granulozyten ähnliche Muster erzeugen können, wird die Formalinfixation zu deren Diskrimination eingesetzt [80, 89, 101].

Der Referenzbereich des IASL hat einen Titer $< 1:20$.

2.2.3 Bestimmung von ANA und ANCA mit visueller Fluoreszenzmikroskopie

Die Bestimmung der ANA im IASL mit visueller Fluoreszenzmikroskopie erfolgt in zwei Schritten: Zuerst werden die Objektträger durch Helmed[®] (Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Deutschland), einem IIF-Pipettierautomaten, vorbereitet. Anschließend werden die vorbereiteten Objektträger von Experten mit einem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich Fluoreszenzmustern untersucht. Zur Verdeutlichung dieses Vorgangs folgt nun eine nähere Beschreibung des IIF-Pipettierautomaten Helmed[®] und seiner Funktionsweise.

Helmed[®]

Bei Helmed[®] handelt es sich um einen IIF-Pipettierautomaten zur Vorbereitung des IIFT ohne integrierte Bewertungseinheit. Für die Testdurchführung wurden Test Kits von Generic Assays GmbH (Dahlewitz/Berlin, Deutschland) verwendet. Die Auswertung geschieht anschließend entweder mit visueller Fluoreszenzmikroskopie durch einen Experten oder durch ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop. Für den Nachweis von ANA lässt sich der Automat mit Objektträgern bestücken, die mit HEp-2-Zellen beschichtet sind. Integrierte Barcodescanner gewährleisten die komplette Nachvollziehbarkeit der Seren und Objektträger. Vollständig automatisiert laufen dann die Pipettier-, Inkubations- und Waschvorgänge des IIFT ab.

Ausgegeben werden nun vollständig vorbereitete Objektträger, auf denen die Antikörper der Patientenserum gebunden und mit Fluorescein-Isothiocyanat markiert sind. Die so für den IIFT vorbereiteten Objektträger werden nun entweder visuell mit einem Fluoreszenzmikroskop von Experten der Autoimmundiagnostik oder durch die automatisierte Bewertungseinheit Aklides[®] hinsichtlich ANA überprüft [102].

Visuelle Fluoreszenzmikroskopie

Im Anschluss an die Vorbereitung durch Helmed[®] folgt die humane visuelle Bestimmung der ANA durch die erfahrenen Experten des IASL. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus AX70, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) werden Positivität sowie die diagnostisch relevanten ANA-Spezifitäten anhand des entsprechenden Anfärbungsmusters erkannt. Zusätzlich zu den Mustern wird als semiquantitatives Ergebnis eine Titerstufe ausgegeben.

Damit die korrekte Bewertung des Fluoreszenzmusters möglich ist, müssen einige Qualitätskriterien erfüllt werden. Dazu gehören eine gute Zelldichte und -verteilung, drei bis fünf Mitosen im Bewertungsfeld bei 200-facher Vergrößerung, die Expression der entsprechenden Zielantigene, der Erhalt der Zellmorphologie und eine Hintergrundfluoreszenz. Zur Vorbereitung des visuellen IIFT erfolgen einige Schritte: Die 50-Watt Quecksilberdampflampe muss eingebrannt und Immersionsöl aufgetragen werden, ebenso sind die Einstellungen der Objektive und die Überprüfung der Positiv- und Negativkontrollen erforderlich. Die konkrete Bewertung der Fluoreszenz geschieht unter 400-facher Vergrößerung. Zuerst wird die Intensität der Fluoreszenz unter Beachtung von mehreren Mitosen bestimmt, sodass das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Fluoreszenzen erkannt wird. Danach wird in mehreren Blickfeldern das zugrundeliegende Fluoreszenzmuster identifiziert und der Titer abgeschätzt. Gegebenenfalls wird eine Verdünnungsreihe angesetzt, um den Endtiter zu bestimmen.

Die Vorbereitung der ANCA-Objektträger erfolgte nicht mit Helmed[®], sondern wurde manuell wie in 2.2.2 *Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztests* beschrieben durchgeführt. Der Bewertungsalgorithmus für ANCA ist derselbe, wobei sich die zugrundeliegenden Substrate (humane neutrophile Granulozyten), Hersteller (Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Deutschland) und Fluoreszenzmuster unterscheiden.

2.2.3 Bestimmung von ANA mit Aklides[®]

Bevor es zur Bestimmung der ANA durch Aklides[®] kam, wurden die vorhergehenden Schritte des IIFT anhand des IIF-Pipettiergeräts Helmed[®] durchgeführt.

Das Konzept des automatisierten Interpretationssystems Aklides[®] für die Bewertung von ANA

und deren Mustererkennung basiert auf der IIF, welche HEP-2-Zellen (Generic Assays GmbH, Dahlewitz/Berlin, Deutschland) verwendet. Die auf HEP-2-Zellen entstehenden IIF-Muster der Serumproben werden automatisch beurteilt. Für die Beurteilung wird ein motorisiertes inverses Mikroskop (Olympus IX81; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) mit einem motorisiertem Mikroskopiertisch (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland), 400-nm und 490-nm Licht emittierende Dioden (CoolLED Ltd., Andover, England) und eine Graustufenkamera (Kappa, Gleichen, Deutschland) verwendet. Das Interpretationssystem wird von einer speziell entwickelten Software gesteuert, welche Algorithmen für die Bereiche Autofokus, Bildanalyse und Mustererkennung enthält. Der Autofokus, welcher auf Haralicks Bildcharakterisation [84] basiert, benutzt DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Medipan GmbH, Dahlewitz, Deutschland) als Fluoreszenzfarbstoff für die Objekterkennung und -einstellung. Um Artefakte zu eliminieren, wird eine zusätzliche qualitative Bildanalyse verwendet, bei der das zu bewertende Bild in Subobjekte gleicher Größe unterteilt wird. Die Objektsegmentierung wird von einem histogrammbasierten Grenzwertalgorithmus durchgeführt, gefolgt von einer Wasserscheidentransformation. Segmentierte Objekte werden durch regionale, topologische und Oberflächentextur-Deskriptoren charakterisiert. Mehr als 1.400 objektbeschreibende Kriterien wurden dafür implementiert. Mitotische Zellen werden durch DAPI-Färbung identifiziert. Die Klassifizierung der Fluoreszenzmuster wird durch eine Kombination von Struktur- und Textureigenschaften sowie definierte Regeln für jedes spezifische Muster erreicht.

Die Immunfluoreszenzbilder werden nach folgender Hierarchie ausgewertet:

1. Positivität,
2. Lokalisation der Färbung und
3. die Bestimmung der nukleären Muster: homogen, fein- und granulär, nukleolär, Centromer und multiple nukleäre Dots.

Ein Intensitätswert eines Bildes wird durch Kombination von absoluter Bildintensität, Kontrast und Anzahl der Graustufen berechnet. Da die Intensität der Muster in Relation zur gesamten Bildintensität steht, handelt es sich um eine einheitenlose Größe. Der Intensitätswert wurde durch die Belichtungszeit modelliert, welche vom stärksten Bildsignal nach Ausschluss von Artefakten abhängig ist. Dadurch können auch Muster mit schwachen absoluten Signalen wie Zentriolen oder nukleäre Dots detektiert werden. Die Bestimmung von Grenzwerten für die Differenzierung von positiven Signalen wurde auf der Grundlage von Intensitätswerten von normalen Blutspendern durchgeführt. Als Grenzwert für Positivität der Fluoreszenzmuster wurde eine Intensität von 100 festgelegt.

Das Ziel dieser Software ist es, die folgenden sechs wichtigsten Muster zuverlässig auf HEp-2-Zellen nachweisen zu können: cytoplasmatisch, homogen, gesprenkelt, nukleolär, Centromer und multiple nukleäre Dots [81, 84].

2.2.4 Bestimmung von ANA und ANCA mit Helios[®]

Das System wurde auf der Grundlage des IIF-Prozessor Helmed[®] entwickelt. Ein optisches System, um die jeweiligen IIF-Muster zu erfassen wurde implementiert und eine spezifische Bildverarbeitungssoftware für die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben entwickelt. Die Ergebnisse können aufgezeichnet, gespeichert, an das Laborinformationssystem übertragen und aus der Ferne validiert werden. Die Testdurchführung fand mit Testkits von Aesku Diagnostics (Wendelsheim, Deutschland) statt.

Helios[®] ist ein vollautomatischer IIF-Prozessor, der die Durchführung aller Schritte des IIFT kontinuierlich von Anfang bis Ende ohne weitere menschliche Bedienung durchführen kann. Je nachdem ob ANA oder ANCA bestimmt werden sollen, müssen mit HEp-2-Zellen bzw. mit humanen neutrophilen Granulozyten beschichtete Objektträger verwendet werden. Das Einlesen der Proben, die Verarbeitung der Objektträger und die Positiv-Negativ-Diskrimination wird daraufhin ausgeführt. Zwei integrierte Barcodeleser (für Proben und Objektträger) stellen die lückenlose Rückverfolgbarkeit der Proben sicher. Um das Austrocknen der Objektträger zu vermeiden, wird ein spezielles 3-Nadelsystem für effiziente, schnelle Pipettiervorgänge und eine besondere Dispensionslösung verwendet. So müssen die Proben nicht abgedeckt werden, was die Komplettbearbeitung ohne weitere menschliche Bedienung ermöglicht. Die für die Erfassung der Muster integrierte Fluoreszenzmikroskopeinheit von Nikon (Tokio, Japan) wird durch einen von Aesku entwickelten Motor gesteuert, der Geschwindigkeit und Genauigkeit sicherstellt. Die Bildverarbeitungssoftware von Helios[®] wird durch einen mathematischen Algorithmus unterstützt, der jedes IIF-Muster analysiert und eine Vorklassifizierung der Ergebnisse auf Grundlage verschiedener Variablen (Strukturanalyse, Fluoreszenzintensität, Zellenverhältnis) bereitstellt. Die Anzahl der aufzunehmenden Bilder pro Verdünnungsreihe lässt sich durch den Benutzer einstellen. Wenn eine eingehende Prüfung erforderlich ist, können Bilder um das 650-fache vergrößert und detailliert bewertet werden. Das Helios[®] arbeitet mit dem Standard-FITC-Fluorochrom (Anregungswellenlänge von 465 bis 499 nm) und benötigt keine zusätzliche Anfärbung zur Objektfokussierung. Diese Eigenschaft macht es bei Bedarf möglich, die Objektträger mit einem anderen Fluoreszenzmikroskop visuell zu überprüfen. Die Cut-off-Einstellungen können an die Bedürfnisse der jeweiligen Labors angepasst werden. Für die endgültige Bewertung der IIF-Muster durch einen Experten werden die Bilder mit der

Vorklassifizierung präsentiert. Das Helios[®]-System selbst stellt keine automatische Interpretation der Musters bereit, aber unterstützt den Benutzer bei der Klassifizierung der verschiedenen Fluoreszenzen durch eine große Musterbibliothek [82, 83, 91].

2.3 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der beschriebenen Methoden wurden mithilfe von Kontingenztafeln, der Berechnung von Cohens Kappa, Spearmans Korrelationskoeffizienten, Pearsons Kontingenzkoeffizienten und der Erstellung einer Receiver Operating Characteristic analysiert. Diese weitergehenden statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics 23, arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen mit Microsoft Excel 2010 berechnet. Prozentangaben wurden gerundet und können daher kumulative Rundungsfehler enthalten.

Kontingenztafeln

Die Kontingenztafeln, die in Kapitel 3 verwendet werden, beruhen auf dem in Tab. 3 dargestellten Beispiel.

Tab. 3: Kontingenztafel zum Vergleich eines diagnostischen Tests mit dem Standardtestverfahren, adaptiert nach Bucher [103]

		Goldstandard-Testverfahren: visuelle Fluoreszenzmikroskopie		
		AAK nachweisbar	AAK nicht nachweisbar	gesamt
Testergebnis	Test positiv	richtig positiv (RP)	falsch positiv (FP)	RP+FP
	Test negativ	falsch negativ (FN)	richtig negativ (RN)	FN+RN
gesamt		RP+FN	FP+RN	N=RP+FP+FN+RN

Die Sensitivität beschreibt den Anteil positiver Testergebnisse unter den Erkrankten, die Spezifität den Anteil negativer Testergebnisse unter den Gesunden. In der vorliegenden Arbeit beziehen sich Sensitivität und Spezifität auf das Goldstandard-Testverfahren, die visuelle Fluoreszenzmikroskopie, da es sich um einen Vergleich verschiedener Testverfahren handelt. Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formeln:

$$Sensitivität = \frac{RP}{RP+FN} \quad \text{und} \quad Spezifität = \frac{RN}{RN+FP}$$

Positiver und negativer prädiktiver Wert (PPW und NPW) sind die Vorhersagewerte von positiven bzw. negativen Testergebnissen. Der PPW ist der Anteil an tatsächlich Erkrankten

unter den Personen mit einem positiven Testergebnis, der NPW ist der Anteil der Gesunden unter den Personen mit einem negativen Testergebnis. Sie lassen sich wie folgt berechnen:

$$PPW = \frac{RP}{RP+FP} \quad \text{und} \quad NPW = \frac{RN}{RN+FN}$$

Für die Verwendung bei präselektierten Patientengruppen sind PPW und NPW nicht zulässig, da sie von der Prävalenz abhängen. Für den Fall von präselektierten Patientengruppen eignen sich hingegen die positive und negative Likelihood Ratio (LR+ und LR-). Sie verwenden Sensitivität und Spezifität, um die Wertigkeit eines diagnostischen Test zu bestimmen und beschreiben, um welchen Faktor sich die Prätestwahrscheinlichkeit zur Posttestwahrscheinlichkeit verändert. Mittels folgender Formeln lassen sie sich berechnen:

$$LR+ = \frac{\text{Sensitivität}}{1-\text{Spezifität}} \quad \text{und} \quad LR- = \frac{1-\text{Sensitivität}}{\text{Spezifität}}$$

Um die berechneten Werte korrekt zu interpretieren, gilt es einige Zusammenhänge zu beachten. Eine $LR > 1$ erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Erkrankung bzw. der AAK vorliegt, eine $LR < 1$ verringert diese. Dementsprechend hat eine $LR = 1$ keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit bzgl. des Vorliegens eines AAK. In Tab. 4 werden der Zusammenhang der LR-Werte und deren diagnostische Aussagekraft dargestellt [104, 105].

Tab. 4: Richtwerte zur Interpretation der Likelihood Ratio, adaptiert nach Schwarzer und Jaeschke [104, 105]

LR-Wert		Interpretation
LR+	LR-	
> 10	< 0,1	überzeugende diagnostische Evidenz mit großer Zunahme/Abnahme der Wahrscheinlichkeit für Vorliegen der AAK
5-10	0,1-0,2	hohe diagnostische Evidenz mit mäßiger Zunahme/Abnahme der Wahrscheinlichkeit für Vorliegen der AAK
2-5	0,2-0,5	schwache diagnostische Evidenz mit kleiner Zunahme/Abnahme der Wahrscheinlichkeit für Vorliegen der AAK
1-2	0,5-1,0	kaum relevante diagnostische Evidenz mit minimaler Zunahme/Abnahme der Wahrscheinlichkeit für Vorliegen der AAK
1	1	keine relevante diagnostische Evidenz ohne Zunahme/Abnahme der Wahrscheinlichkeit für Vorliegen der AAK

Cohens Kappa

Der Cohen Kappa-Koeffizient (κ) ist ein statistisches Maß für die Interrater-Reliabilität, also die Übereinstimmung zweier Bewerter in der Beurteilung von kategorialen Merkmalen. Da Cohens Kappa den zufallskorrigierten Anteil der Übereinstimmung misst, ist er der Berechnung der prozentualen Übereinstimmung überlegen. Der Kappa-Koeffizient ist definiert als:

$$\kappa = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Dabei ist p_o die beobachtete prozentuale Übereinstimmung und p_e der Anteil an zufälliger Übereinstimmung [106]. Die für die Verwendung von Cohens Kappa bestehenden Vorbedingungen sind erfüllt: Bei der Positiv-Negativ-Diskrimination handelt es sich um nominale, sich gegenseitig ausschließende Daten mit gleicher Anzahl an Kategorien. Die Bewerter machen gepaarte Beobachtungen, es werden dieselben Serien überprüft. Die Bewerter agieren unabhängig voneinander und sind spezifisch ausgewählt.

Die Wertigkeit der Übereinstimmung in Abhängigkeit von κ wird in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Richtwerte zur Interpretation von κ , nach Altman [107]

κ-Wert	Stärke der Übereinstimmung
0,81-1,00	sehr gut
0,61-0,80	gut
0,41-0,60	mittelmäßig
0,21-0,40	leicht
< 0,20	schwach

Receiver Operating Characteristic (ROC)

Sensitivität und Spezifität sind zwei Gütekriterien, die die Validität eines diagnostischen Tests für dichotome Ergebnisse mit einem Goldstandard vergleichen. Eine Receiver Operating Characteristic Curve ist ein Funktionsgraph, der die gegenseitige Abhängigkeit zwischen Sensitivität und Spezifität über eine Reihe von Cut-off-Werten darstellt. Dafür wird die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) gegenüber der Falsch-Positiv-Rate (1-Spezifität) aufgetragen. ROC ist eine effektive Methode zur Bewertung der diagnostischen Güte eines Tests und kann auch als Optimierungsmethode für den Cut-off-Wert verwendet werden [108].

Ursprünglich wurde die ROC-Analyse für die Erkennung von Radarbildern im Zweiten Weltkrieg entwickelt, kurze Zeit darauf hielt sie Einzug in die Psychologie und Medizin [109, 110].

Die Fläche unter dem Graphen ist ein Maß für die Güte des Tests und kann mithilfe der Area Under The Curve (AUC) berechnet werden. Dabei kann sie Werte von 0,5, was einem Zufallsergebnis entspricht und 1, was einem perfekten Test mit 100-prozentiger Sensitivität und Spezifität entspricht, annehmen. Die Richtwerte zur Interpretation können Tab. 6 entnommen werden.

Tab. 6: Richtwerte zur Interpretation von AUC-Werten, nach Ludemann [111]

AUC-Wert	Güte der Trennschärfe
0,91-1,00	sehr gut
0,81-0,90	gut
0,71-0,80	mäßig
0,61-0,70	schwach
0,50-0,60	ungeeignet

Um den optimalen Cut-off-Wert zu ermitteln, können drei verschiedene Kriterien bestimmt werden, der Youden-Index, der Punkt, der dem (0,1)-Punkt am nächsten ist und das minimale Kosten Kriterium. Letzteres wird in der Medizin kaum benutzt, da die Bestimmung der Kosten (z.B. die einer Falschdiagnose) schwer zu bestimmen sind. Der (0,1)-Punkt ist der ideale Test; um den Punkt zu finden, der dem am nächsten kommt, gilt folgende Formel:

$$d = \sqrt{(1 - S_n)^2 + (1 - S_p)^2}$$

Dabei steht d für die Distanz, die es zu minimieren gilt, S_n für Sensitivität und S_p für Spezifität. Der Youden-Index maximiert die vertikale Distanz der Zufallsgeraden zur ROC-Kurve, es ist also der Punkt der ROC-Kurve, der am weitesten von der Zufallsgeraden entfernt ist. Die Formel zur Berechnung ist definiert als:

$$J = \max(S_n + S_p)$$

J steht dabei für den Youden-Index, S_n für Sensitivität, S_p für Spezifität [108-110, 112].

Die ROC-Analyse wurde ausschließlich für Aklides[®] durchgeführt, da Helios[®] keine Intensitätswerte ausgibt.

Spearman's Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's Rho)

Der Rangkorrelationskoeffizient von Spearman (ρ) wurde genutzt, um den Zusammenhang der von Aklides[®] gemessenen Intensitäten sowie die visuell bestimmten Titer zu untersuchen. Es handelt sich um eine nichtparametrische Korrelation, deren Bestimmung die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Rangreihen berechnet. Die Voraussetzung für zwei mindestens ordinalskalierte Variablen sind erfüllt, die Intensität ist rational-, die Titer sind intervallskaliert. Im Gegensatz zu Pearsons Korrelationskoeffizienten wird nicht von einem linearen Zusammenhang, sondern von einem monotonen Zusammenhang ausgegangen. Spearman's Rangkorrelationskoeffizient ist robust gegenüber Ausreißern. Er kann anhand folgender Formeln berechnet werden:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n (r_i - s_i)^2}{n^3 - n}$$

Dabei gilt: r_i ist der Rangplatz der Variable X des i. Merkmalsträgers, s_i ist der Rangplatz der Variable Y des i. Merkmalsträgers und n die Anzahl der Merkmalsträger. Es handelt sich um die vereinfachte Formel für verbundene Rangplätze. Werte von +1, für perfekten Zusammenhang bis -1, für perfekten negativen Zusammenhang sind möglich. Je näher ρ an Null ist, desto geringer ist der Zusammenhang. Aus Tab. 7 lassen die Richtwerte zur Interpretation von ρ entnehmen [113].

Tab. 7: Richtwerte zur Interpretation von ρ , nach Bortz [113]

ρ-Wert	Ausmaß der Korrelation
0,80-1,00	sehr stark
0,60-0,79	stark
0,40-0,59	mäßig
0,20-0,39	schwach
0,00-0,19	sehr schwach

Die Korrelation von Titer und Intensität konnte nur für Aklides[®] berechnet werden, da Helios[®] keine Intensitätswerte ausgibt.

Pearsons Kontingenzkoeffizient

Auf Grundlage des Chi-Quadrat-Tests kann Pearsons Kontingenzkoeffizient zur Bestimmung des Maßes an Übereinstimmung berechnet werden. Der Chi-Quadrat-Test ist wie folgt definiert:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dabei steht O_i für die beobachtete Anzahl und E_i für die erwartete Anzahl der Messwerte. Die Voraussetzungen für die Verwendung des Tests sind das Vorliegen von kategorialskalierten Daten, eine Stichprobengröße von mindestens 50 sowie ein Minimum von 5 erwarteten Beobachtungen für jede Zelle der Kontingenztabelle. Bei der Positiv-Negativ-Diskrimination handelte es sich um kategoriale Daten. Die Größe der Stichproben sowie die Anzahl der Beobachtungen in den meisten Zellen war meist ausreichend. Wenn die Stichprobengröße oder die erwarteten Häufigkeiten in den untersuchten Zellen zu klein waren, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Der Chi-Quadrat-Test kann zur Bestimmung von Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit verwendet werden. Um den Grad der Abhängigkeit zu bestimmen, wurde auf Grundlage des Chi-Quadrat-Tests Pearsons Kontingenzkoeffizient (C_p) entwickelt. Die entsprechende Formel lautet:

$$C_p = \sqrt{\frac{\chi^2}{\chi^2 + n}}$$

Wobei χ^2 für den Chi-Quadrat-Test steht und n für die Anzahl der Beobachtungen. Dieser Koeffizient skaliert den Chi-Quadrat-Test auf Werte von Null für keinen Zusammenhang und 1 für den perfekten Zusammenhang. In Tab. 8 werden die Richtwerte zur Interpretation von Pearsons Kontingenzkoeffizienten dargestellt [113].

Tab. 8: Richtwerte zur Interpretation des Kontingenzkoeffizienten, nach Bortz [113]

C_p-Wert	Stärke des Zusammenhangs
0,80-1,00	sehr stark
0,60-0,79	stark
0,40-0,59	mäßig
0,20-0,39	schwach
0,00-0,19	sehr schwach

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse ANA

3.1.1 visuelle Mikroskopie

Gesamtkollektiv

Von den 1008 ANA-Seren wurden in der visuellen Mikroskopie 533 (53%) als positiv und 475 (47%) als negativ bewertet. Das Vorkommen sowie die Verteilung der Fluoreszenzmuster wird in Tab. 9 dargestellt. Bei den positiven Seren waren feingranuläre mit 34% sowie homogene mit 10% die häufigsten Fluoreszenzmuster. Unter den negativen Seren waren die cytoplasmatischen AK mit 113 Seren das Fluoreszenzmuster mit der größten Häufigkeit.

Tab. 9: Verteilung der ANA-Muster in positiven und negativen Seren des Gesamtkollektivs

Bewertung	Muster	Anzahl	Prozent
positiv	gesamt	533	53%
	Centromer	10	1%
	feingranulär	340	34%
	granulär	22	2%
	homogen	102	10%
	nukleäre Dots	4	< 1%
	nuclear envelope	2	< 1%
	nukleolär	53	5%
negativ	gesamt	475	47%
	Centrosomen	8	1%
	cytoplasmatische AK	113	11%
	cytoplasmatische Dots	4	< 1%
	Cytoskelett-AK	10	1%

Die Verteilung der Titer der Seren wird in Abb. 2 dargestellt. Es bestand ein deutlicher, negativer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Seren und Höhe der Titerklasse, je höher die Titer, desto geringer war ihr Vorkommen. Die größte Stufe befand sich zwischen der Titerklasse 1:160 mit 367 Seren und der Titerklasse 1:320 mit 71 Seren. Die stark positiven Seren mit einem

Titer $\geq 1:320$ machten 16%, negative und schwach positive Seren zusammen 84% der Ergebnisse aus.

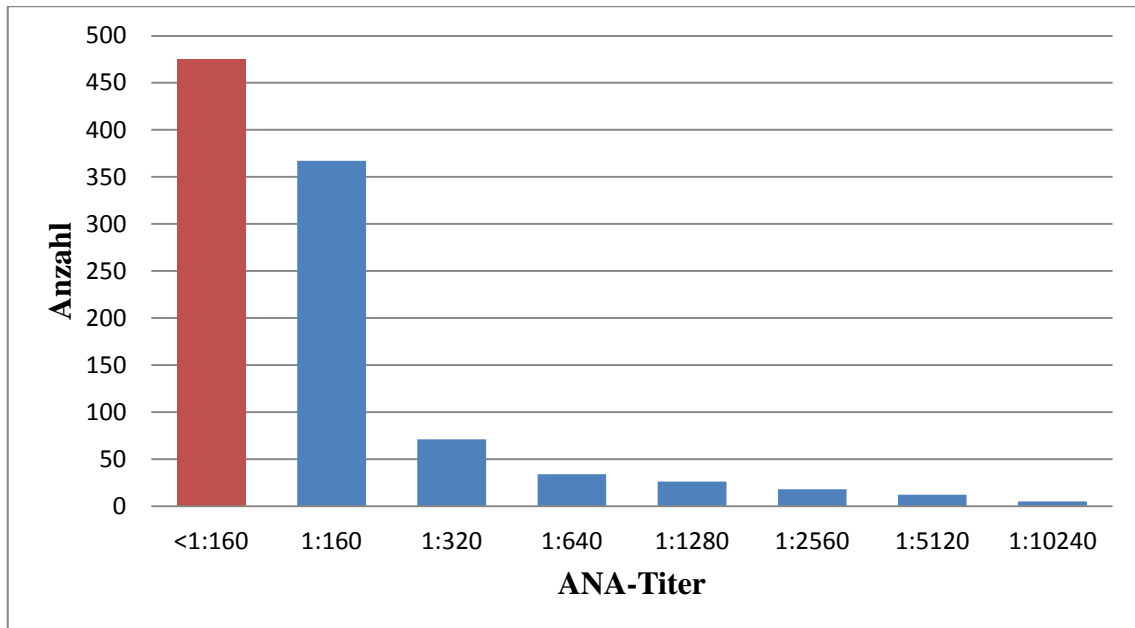


Abb. 2: ANA-Titerverteilung im Gesamtkollektiv

Stichprobe

In der Stichprobe der 118 Patienten wurden in der visuellen Mikroskopie 63 (53%) der Seren als positiv und 55 (47%) der Seren als negativ bewertet. Dies entsprach exakt den Werten der Gesamtmenge. Auch die Verteilung der einzelnen Muster zeigte eine sehr ähnliche Verteilung mit nur geringfügigen prozentualen Abweichungen, z.B. 34% feingranuläre in der Gesamtmenge zu 33% in der Stichprobe oder 11% cytoplasmatische AK insgesamt zu 14% in der Stichprobe. Die weiteren Details von Aufkommen und Verteilung der Muster werden in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Verteilung der Muster in positiven und negativen Seren der ANA-Stichprobe

Beurteilung	Muster	Anzahl	Prozent
positiv	gesamt	63	53%
	Centromer	1	< 1%
	feingranulär	39	33%
	homogen	15	13%
	nuclear envelope	1	< 1%
	nukleolär	7	6%
negativ	gesamt	55	47%
	cytoplasm. AK	17	14%
	cytoplasm. Dots	1	< 1%

Die Verteilung der Titer bei den 118 Patienten ist in Abb. 3 dargestellt. Die Titerklassen in der Stichprobe zeigten in ihren Häufigkeiten eine große Übereinstimmung mit denen der Gesamtmenge. Während die Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse prozentual exakt mit denen der Stichprobe übereinstimmten (53% positiv, 47% negativ), gab es unter den Positiven 3% weniger schwach Positive und dementsprechend 3% mehr stark positive Ergebnisse.

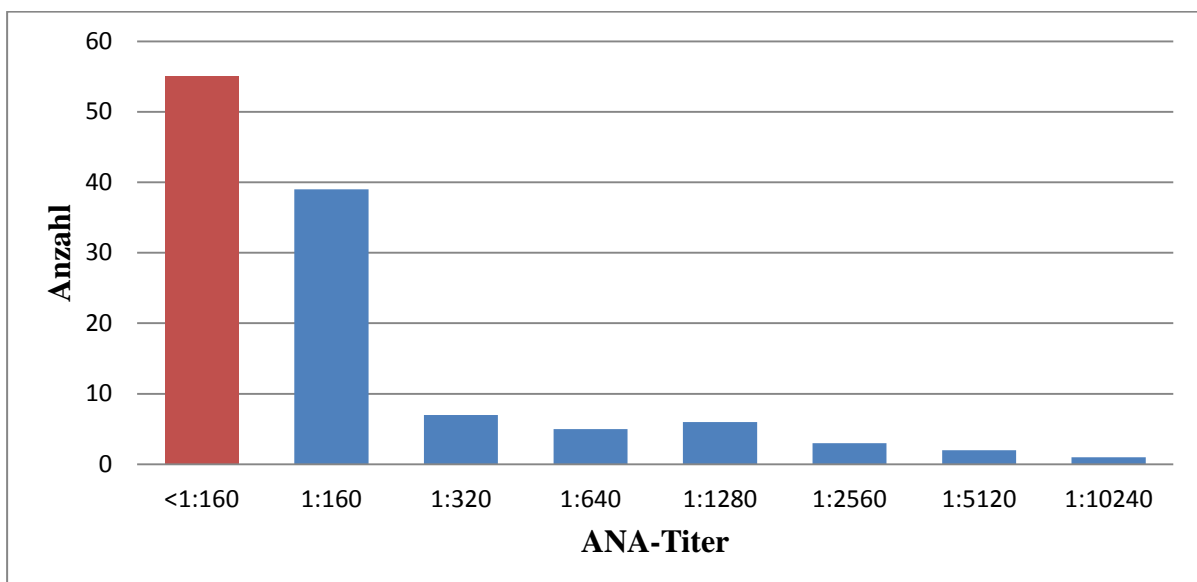


Abb. 3: ANA-Titerverteilung in der Stichgruppe

Ergebnisse der Subgruppen (RE, NRE, DK)

In der Gruppe der rheumatisch Erkrankten waren 59% der Seren ANA-positiv und 41% negativ. Bei den nicht rheumatisch Erkrankten lag der Prozentsatz der Positiven bei 26% und der der Negativen bei 74%. In der Subgruppe Diagnosekriterium wurden 100% der Messwerte positiv bewertet.

Von den Fluoreszenzmustern aus Tab. 10 gehörten fünf positive (vier feingranuläre und ein nukleolärer) sowie 14 negative Seren (vier cytoplasmatische AK, keine weiteren Muster) zu der Gruppe der nicht rheumatisch Erkrankten. Die restlichen Muster gehörten zu der Gruppe der rheumatisch Erkrankten. Die zwölf Muster der Diagnosegruppe setzten sich aus einem Centromer, fünf feingranulären, vier homogenen, einem nuclear envelope und einem nukleolären Muster zusammen.

Eine detaillierte Aufschlüsselung der Titerverteilung findet sich in Abb. 4. Es war zu erkennen, dass bei den Rheuma-Patienten höhere ANA-Titer vorlagen, als bei den Nicht-Rheuma-Patienten. Bei den Patienten ohne rheumatische Diagnose war die Stufe zwischen den Titerklassen 1:160 und 1:320 nicht so stark ausgeprägt, wie bei den rheumatisch Erkrankten. Es gab allerdings bereits eine Abstufung zwischen negativen (< 1:160) und schwach positiven (1:160) Titern. Nur ein Patient ohne rheumatische Diagnose hatte einen ANA-Titer von 1:320. Bei den rheumatisch Erkrankten zeigte sich eine deutliche Stufe zwischen den Titerklassen 1:160 und 1:320. Es wurden insgesamt deutlich höhere Titer festgestellt. Ab dem Titer von 1:640 gehörte ein großer Teil der Rheuma-Patienten auch der Gruppe „Diagnosekriterium“ an, bei Titern $\geq 1:2560$ gehörten alle Patienten der „Kriteriumsgruppe“ an.

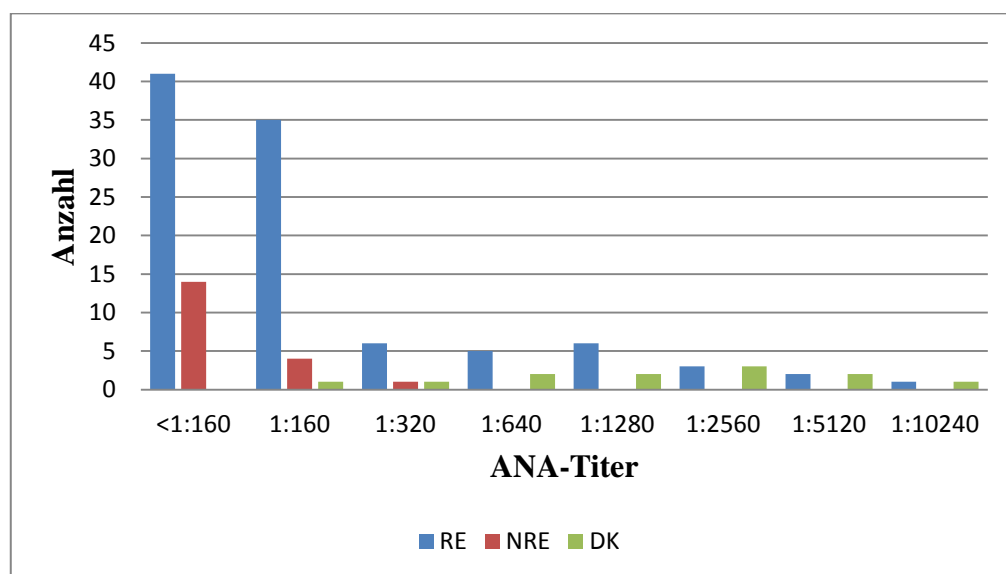


Abb. 4: ANA-Titerverteilung der Subgruppen RE, NRE, DK

In Abb. 5 wird die Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit von ANA-Titern für Kollagenosen, bei denen ANA Diagnosekriterium ist, dargestellt. Bei einem Titer von 1:160 werden alle Kollagenosen erfasst, die Spezifität liegt knapp über 50%. Ab einem Titer von 1:2560 hat die Spezifität 100% erreicht, die Sensitivität ist auf 50% gesunken. Von besonderem klinischen Interesse ist der Bereich von 1:160 bis 1:640.

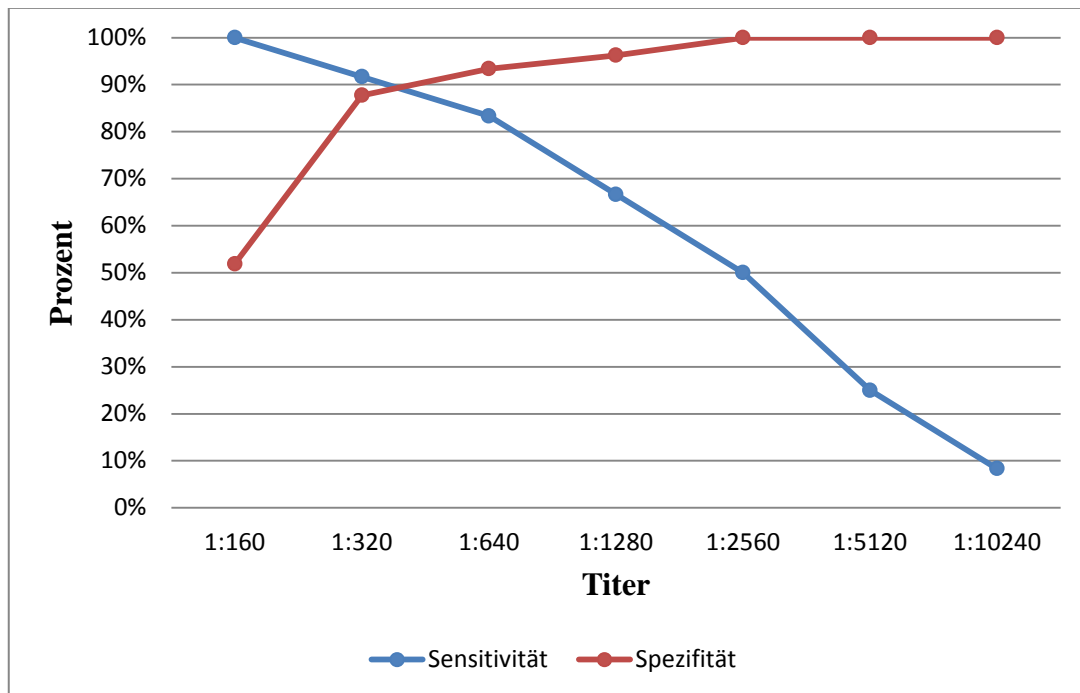


Abb. 5: Sensitivität und Spezifität von ANA-Titern für Kollagenosen mit ANA als Diagnosekriterium

3.1.2 Aklides®

Gesamtkollektiv

Bei der Messung der Grundgesamtheit von 1008 Seren wurde für den Aklides® eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 59% festgestellt. Die Korrekturklassifikationsrate betrug 75%, sie setzte sich aus der Summe von richtig positiven Testergebnissen (47%) und richtig negativen Testergebnissen (28%) zusammen. Der positive prädiktive Wert lag bei 71% und der negative prädiktive Wert bei 83%. Der Kappa-Wert mit 0,494 ($p \leq 0,001$) sowie Pearsons Kontingenzkoeffizient mit 0,457 ($p \leq 0,001$) beschrieben eine mäßige Übereinstimmung [107, 113]. Die zugehörige Kontingenztabelle ist in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Aklides[®]: Kontingenztabelle des ANA-Gesamtkollektivs

ANA-Gesamtkollektiv	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Aklides [®] : positiv	476 (47%)	193 (19%)	669	PPW: 71%
Aklides [®] : negativ	57 (6%)	282 (28%)	339	NPW: 83%
gesamt	533	475	1008	
	Sensitivität: 89%	Spezifität: 59%		

In dem Bereich stark positiver Werte, mit einem Titer $\geq 1:320$, wurden 165/166 Werte richtig positiv bewertet und ein Wert als falsch negativ. So galt für diesen Bereich eine Sensitivität von 99%. Mangels negativer Werte, konnte dort keine Spezifität berechnet werden. Da dies das einzige Serum mit einem Titer von 1:320 war, welches als falsch negativ eingestuft wurde (von Aklides[®] und Helios[®]), wurde das Serum erneut visuell überprüft. In der Nachkontrolle stellte sich das Serum als negativ heraus. Die Ursache dafür ließ sich nicht ermitteln. In der Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde das ursprüngliche positive Ergebnis verwendet.

Unter den 193 falsch positiven Messergebnissen wurden mittels visueller Mikroskopie sieben Centrosomen, drei cytoplasmatische Dots, 72 cytoplasmatische AK und sechs Cytoskelett-AK festgestellt.

Von den 57 falsch negativen Testergebnissen handelte es sich in 56 der Fälle um einen Titer von 1:160 und in einem Fall um einen Titer von 1:320 (nukleoläres Muster). Dabei wurden 38 feingranuläre, vier granuläre, sieben homogene sowie acht nukleoläre Fluoreszenzmuster identifiziert. Die prozentuale Verteilung der Muster unter den falsch Negativen wich von der prozentualen Verteilung der Muster unter den visuell positiv bestimmten ab. Nukleäre Dots, nuclear envelope und Centromere wurden nicht falsch negativ klassifiziert. Feingranuläre (3%), granuläre (3%) und nukleoläre (4%) Muster wurden häufiger, wohingegen homogene Muster (-7%) seltener falsch positiv klassifiziert wurden.

Die Lichtintensität der Fluoreszenzmuster korrelierte gut mit der Höhe des Titers. Spearmans Rangkorrelationskoeffizient betrug 0,680 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,646-0,711 bei hoher Signifikanz ($p < 0,001$).

In Abb. 6 wird die Beziehung der Intensität zu dem Titer graphisch anhand eines Boxplot dargestellt. Es zeigte sich, dass ein positiver Zusammenhang zwischen Höhe des Titers und der Intensität bestand. Jede Titerklasse hatte in dem unteren Quartil, dem Median und dem oberen Quartil höhere Werte, als die nächstkleinere Titerklasse. Bei den Maximal- bzw. Minimalwerten

war dies nicht der Fall. Insgesamt waren die Maximal- bzw. Minimalwerte im Verhältnis zu den Quartilen recht groß, was für eine große Streuung sprach. Besonders deutlich war dies in den Titerklassen 1:1280 und 1:5120. Die Titerklassen grenzten sich durch ihre zugehörigen Intensitätswerte nicht voneinander ab. So ist der höchste Intensitätswert der Titerklasse der negativen Ergebnisse (<1:160) mit 693 nur geringfügig kleiner, als der kleinste Wert der höchsten Titerklasse von 1:10240 mit 758. Auch lässt sich erkennen, dass der Median der negativen Titerklasse (<1:160) nur knapp unter dem Cut-off-Wert von 100 lag und damit die vielen falsch Positiven erklärt.

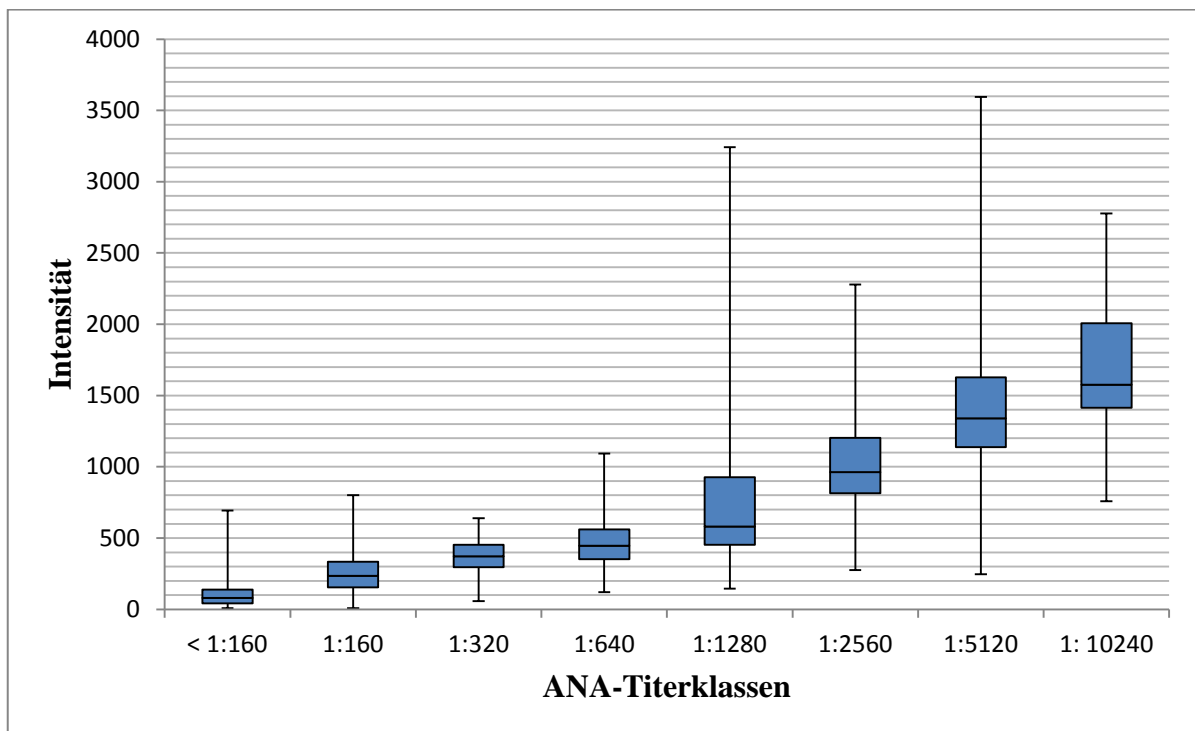


Abb. 6: Aklides®: Verteilung von Intensitätswerten innerhalb von ANA-Titerklassen im Gesamtkollektiv

Receiver Operating Characteristic (ROC)

Eine Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurvenanalyse wurde zur Bestimmung des optimalen Cut-off-Wertes bei der Intensität des Aklides®-Automaten für die gesamten (n = 1008) Messwerte durchgeführt (Abb. 7). Für die Area under the Curve (AUC) ergab sich ein Wert von 0,851 (KI = 0,827-0,875) bei sehr hoher Signifikanz (p < 0,001). Der Test weist Trennschärfe auf, da er sich signifikant von der Diagonalen (links unten - rechts oben), die ein Zufallsergebnis repräsentiert, unterscheidet. Somit handelt es sich um ein geeignetes Verfahren Positivität und Negativität zu testen. Der IIF-Prozessor Aklides® zeigte mit einem AUC-Wert von 0,851 eine

gute Genauigkeit.

Um den optimalen Grenzwert für die positiv-negativ Diskrimination zu ermitteln, wurden der Youden-Index und der Punkt, der dem (0,1)-Punkt am nächsten ist, berechnet. Als optimaler Cut-off-Wert ergab sich eine Intensität von 165. Beide Kriterien gewichten Sensitivität und Spezifität gleichermaßen und vernachlässigen andere Aspekte, wie individuelle Nachteile eines falschen Testergebnisses oder ökonomische Gesichtspunkte [108].

Für einen Cut-off-Wert von 165 würde sich eine Sensitivität von 77% und eine Spezifität von 83% ergeben. Es entstünden 122 falsch negative Testergebnisse mit folgender Titerverteilung: 110-mal 1:160, 6-mal 1:320, 4-mal 1:640, 2-mal 1:1280. Bei 80 falsch positiven Resultaten würden sich drei Centrosomen, drei cytoplasmatische Dots, 39 cytoplasmatische AK und vier Cytoskelett-AK zeigen.

Prinzipiell ist es möglich, anhand der ROC-Kurve für jede gewünschte Sensitivität bzw. Spezifität einen Cut-off-Wert zu bestimmen. Der maximale Cut-off-Wert ohne falsch negatives Testergebnis mit einem Titer $\geq 1:640$, wäre ein Intensitätswert von 120. Es ergäbe sich eine Sensitivität von 86%, eine Spezifität von 68%, 72 falsch negative Ergebnisse (70 Mal 1:160, zwei Mal 1:320) und 153 falsch positive Resultate (sechs Centrosomen, drei cytoplasmatische Dots, 59 cytoplasmatische AK, vier Cytoskelett-AK).

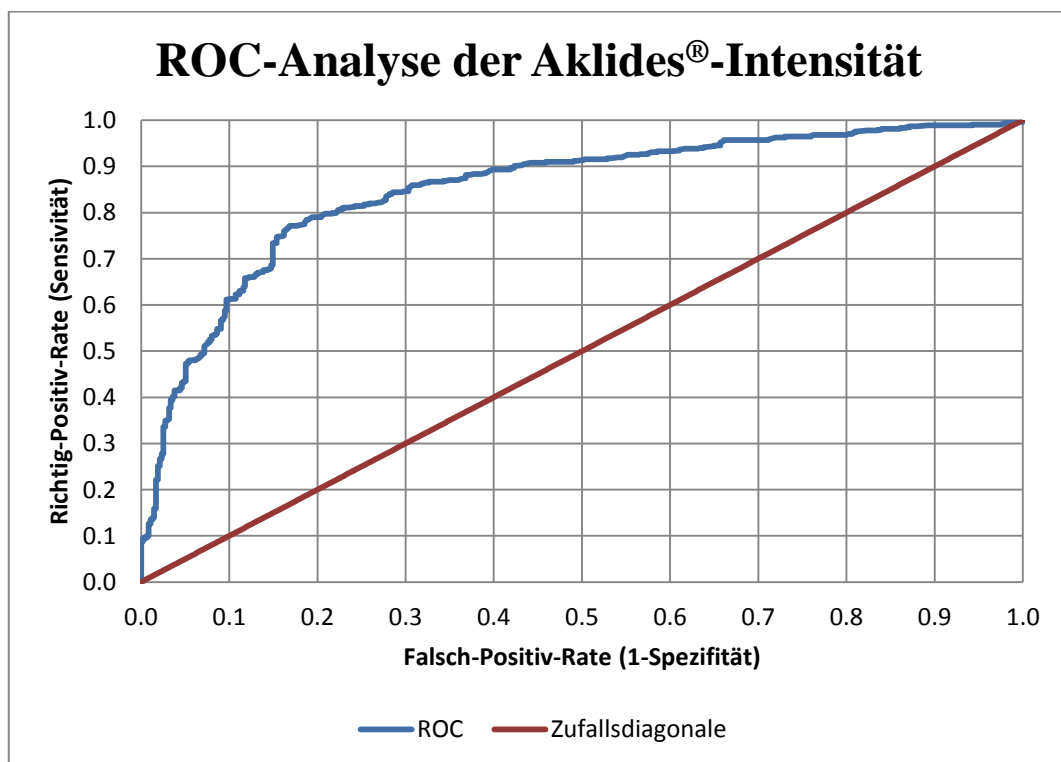


Abb. 7: Aklides[®]: ROC-Kurve der Intensitätswerte bei ANA-Bestimmung

Stichprobe

In der Stichprobe der 118 Patienten stellte sich bei Aklides[®] eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 71% heraus (Tab. 12). Damit befanden sich 76% der Ergebnisse (43% RP, 33% RN) in Übereinstimmung zur visuellen Mikroskopie bzgl. der Positiv-Negativ-Diskrimination. Sowohl der positive als auch der negative prädiktive Wert betragen sich auf 76%. Der Kappa-Wert betrug 0,521 ($p \leq 0,001$), Pearsons Kontingenzkoeffizient 0,463 ($p \leq 0,001$). Beide Werte entsprachen damit einer mäßigen Übereinstimmung mit dem Goldstandard.

Unter den 16 falsch positiven Ergebnissen befanden sich neun Mal cytoplasmatische AK. Von den zwölf falsch negativen Werten hatten elf ein feingranuläres und einer ein nukleäres Muster; der Titer betrug in allen zwölf Fällen 1:160.

Von den 24 Seren mit einem Titer $\geq 1:320$ wurden alle 24 richtig positiv bewertet. Dies entspricht einer Sensitivität von 100%, bei nicht feststellbarer Spezifität für diesen Wertebereich.

Tab. 12: Aklides[®]: Kontingenztabelle der ANA-Stichprobe

ANA-Stichprobe	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Aklides [®] : positiv	51 (43%)	16 (14%)	67	PPW:76%
Aklides [®] : negativ	12 (10%)	39 (33%)	51	NPW:76%
gesamt	63	55	118	
	Sensitivität: 81%	Spezifität: 71%		

Für die Mustererkennung zeigte sich, dass Aklides[®] 43% der ANA-positiven Muster erkannte (1/1 Centromer, 0/1 nuclear envelope, 15/39 feingranulären, 7/15 homogenen, 4/7 nukleolären Mustern). Repräsentative Aufnahmen von Mustern von Patienten sind in Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12 dargestellt.

Innerhalb des negativen bewerteten Anteils wurden 64% korrekt erkannt (35/37 musterlose negative Seren, 0/17 cytoplasmatische AK, 0/1 cytoplasmatischen Dots).

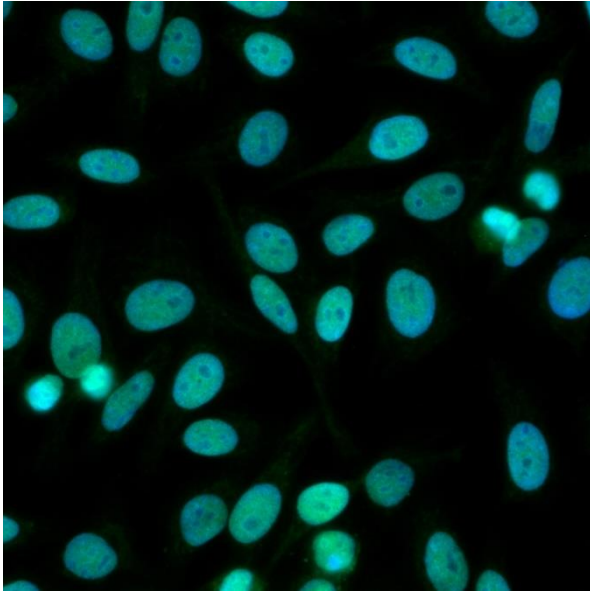


Abb. 8: Aklides®: Pat. A, homogenes Muster

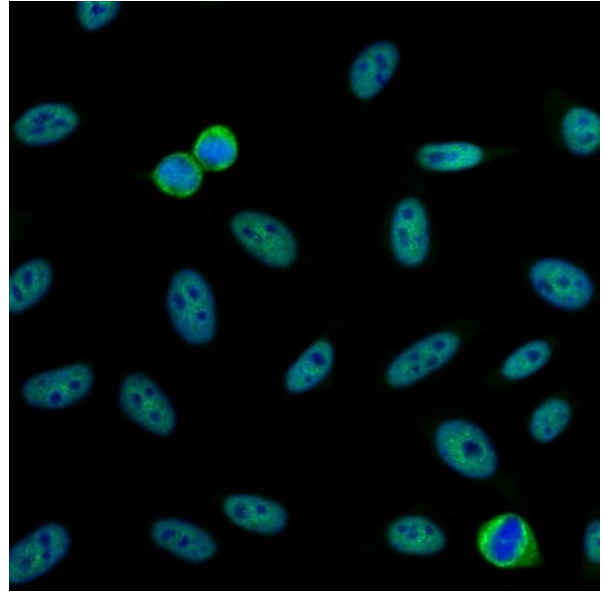


Abb. 9: Aklides®: Pat. B, feingranuläres Muster bei syst. Sklerose

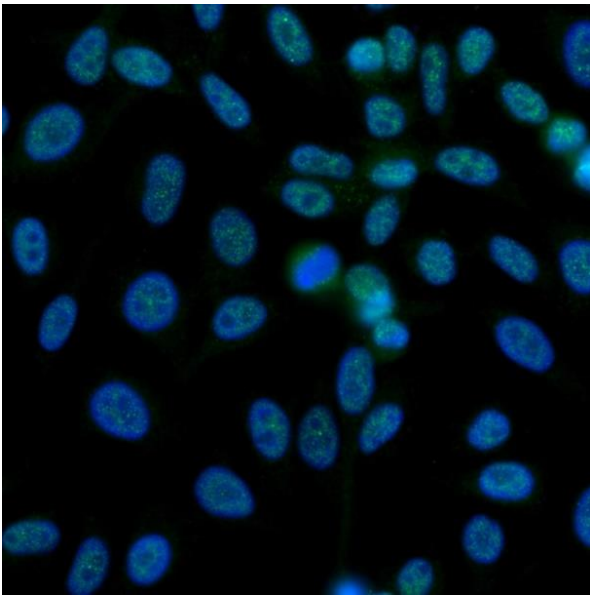


Abb. 10: Aklides®: Pat. C, feingranuläres Ro/La Muster bei syst. Sklerose

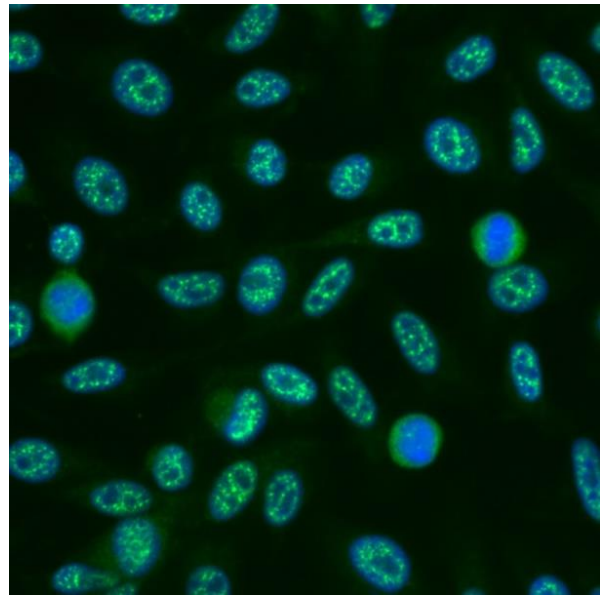


Abb. 11: Aklides®: Pat. D, granuläres Muster

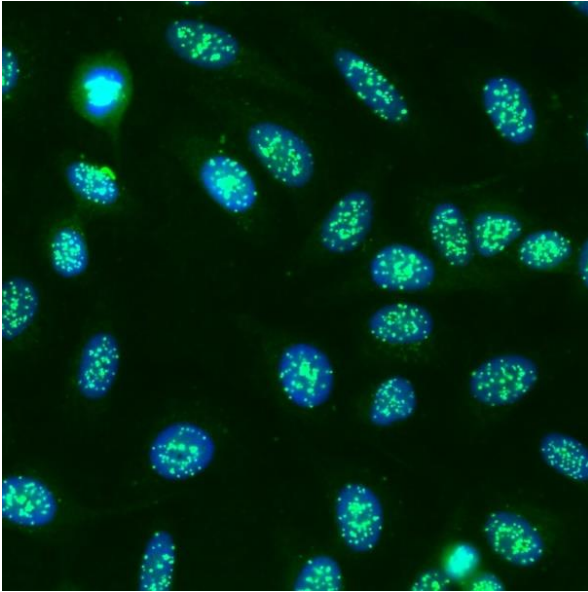


Abb. 12: Aklides[®]: Pat. E, Centromer-Muster bei syst. Sklerose

Subgruppen

Aklides[®] erreichte bei den rheumatisch Erkrankten eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 71%. Bei der Gruppe der nicht rheumatisch Erkrankten wurde eine Sensitivität von 40% sowie eine Spezifität von 71% ermittelt. In der Teilgruppe DK wurden alle zwölf Seren richtig positiv bewertet, sodass sich eine Sensitivität von 100% bei nicht berechenbarer Spezifität ergab. Für die Subgruppe NRE wurde ein mittlere Intensität von 104, für die Subgruppe RE 272 und für deren Teilgruppe DK 786 ermittelt.

3.1.3 Helios®

Gesamtkollektiv

Bezogen auf die Gesamtheit der 1008 Seren erreichte das Helios®-System eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 54% (Tab. 13). Die prozentuale Übereinstimmung lag bei 71%. Als positiver prädiktiver Wert wurde 68%, als negativer prädiktiver Wert 79% ermittelt. Der Kappa-Wert von 0,415 ($p \leq 0,001$) beschrieb eine mäßige Übereinstimmung [107]. Pearsons Kontingenzkoeffizient lag mit 0,399 ($p \leq 0,001$) an der Grenze von schwacher (0,20-0,39) zu mäßiger (0,40-0,59) Übereinstimmung, siehe Tab. 8 [113].

Für stark positive Seren, mit einem Titer $\geq 1:320$, wurden 165 Werte richtig positiv bewertet und ein Wert als falsch negativ, sodass für diesen Bereich eine Sensitivität von 99% erreicht wurde. Da es sich um einen Bereich positiver Werte handelt, konnte keine Spezifität berechnet werden. Weil dies das einzige Serum mit einem Titer von 1:320 war, welches als falsch negativ eingestuft wurde (von Aklides® und Helios®), wurde das Serum erneut visuell überprüft. In der Nachkontrolle stellte sich das Serum als negativ heraus. Die Ursache dafür ließ sich nicht ermitteln. In der Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde das ursprüngliche positive Ergebnis verwendet.

Von den 69 vom Helios®-System falsch negativ bewerteten Seren hatten 68 einen Titer von 1:160 und ein Serum einen Titer von 1:320 (nukleoläres Muster). Dabei handelte es sich um 48 feingranuläre, vier granuläre, vier homogene und 13 nukleoläre Fluoreszenzmuster.

In 220 Fällen wurden Seren als falsch positiv bewertet. In der visuellen Mikroskopie zeigte sich, dass sich darunter drei Centrosomen, vier cytoplasmatische Dots, 79 cytoplasmatische AK und vier Cytoskelett-AK befanden.

Tab. 13: Helios®: Kontingenztabelle des ANA-Gesamtkollektivs

ANA-Gesamtkollektiv	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios®: positiv	464 (46%)	220 (22%)	684	PPW:68%
Helios®: negativ	69 (7%)	255 (25%)	324	NPW: 79%
gesamt	533	475	1008	
	Sensitivität: 87%	Spezifität: 54%		

Stichprobe

In der Stichprobe von 118 Patienten wurde eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 54% festgestellt (Tab. 14). Richtig positive und richtig negative Ergebnisse machten 71% der Ergebnisse aus. Der positive Vorhersagewert lag bei 67%, während der negative Vorhersagewert bei 80% lag. Mit einem signifikanten ($p \leq 0,001$) Kappa-Wert von 0,407 ergab sich eine mäßige Übereinstimmung für die Positiv-Negativ-Diskrimination des Helios[®]-Systems. Pearsons Kontingenzkoeffizient lag mit 0,399 ($p \leq 0,001$) an der Grenze von schwacher (0,20-0,39) zu mäßiger (0,40-0,59) Übereinstimmung, siehe Tab. 8 [113].

Im Bereich stark positiver Seren (Titer $\geq 1:320$) wurden alle 24 Proben richtig positiv identifiziert, daher bestand eine Sensitivität von 100% und eine nicht berechenbare Spezifität.

Die sieben falsch negativen Werte der Stichprobe hatten alle einen Titer von 1:160; es wurden fünf granuläre, ein homogenes und ein nukleoläres Muster registriert.

In 15 der 27 falsch positiven Ergebnisse zeigten sich cytoplasmatische AK in der visuellen IIF-Interpretation.

Tab. 14: Helios[®]: Kontingenztabelle der ANA-Stichprobe

ANA-Stichprobe	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios [®] : positiv	56 (47%)	27 (23%)	83	PPW:67%
Helios [®] : negativ	7 (6%)	28 (24%)	35	NPW:80%
gesamt	63	55	118	
	Sensitivität: 87%	Spezifität: 54%		

Subgruppen

Für die Subgruppe der rheumatisch Erkrankten wurde eine Sensitivität von 90% sowie eine Spezifität von 44% ermittelt. Für die Gruppe der nicht rheumatisch erkrankten Patienten wurde eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 71% festgestellt. Alle zwölf Seren der Subgruppe DK wurden richtig positiv bewertet, daher ergab sich eine Sensitivität von 100% bei nicht messbarer Spezifität.

Helios[®] präsentiert Aufnahmen von Fluoreszenzmustern und überlässt dem Benutzer deren Klassifikation. In Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17 werden repräsentative Aufnahmen von Patienten gezeigt.

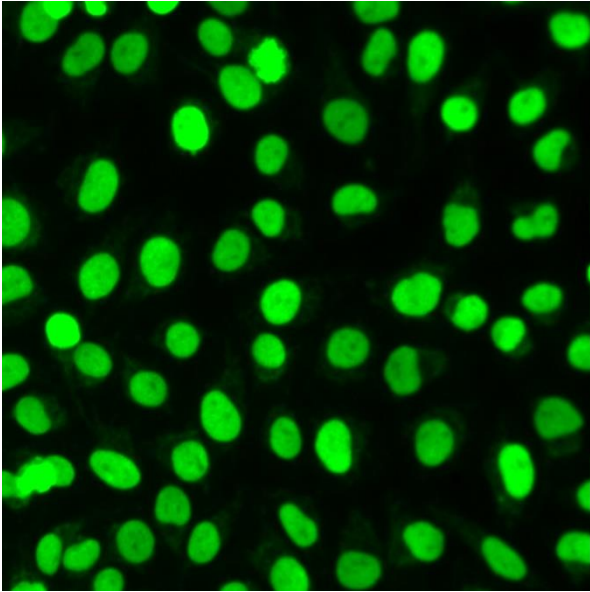


Abb. 13: Helios[®]: Pat. A, homogenes Muster

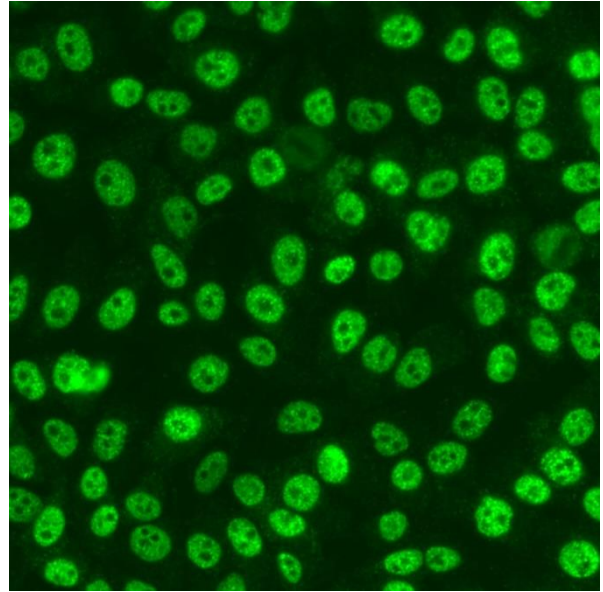


Abb. 14: Helios[®]: Pat. B, feingranuläres Muster bei syst. Sklerose

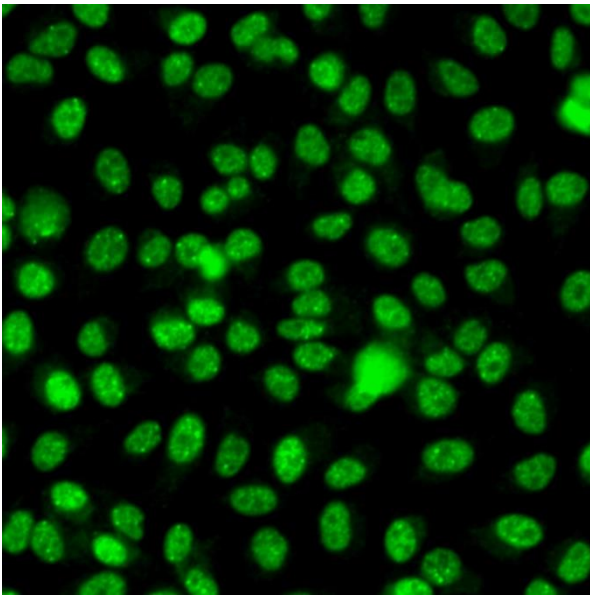


Abb. 15: Helios[®]: Pat. C, feingranuläres Muster
Ro\La bei syst. Sklerose

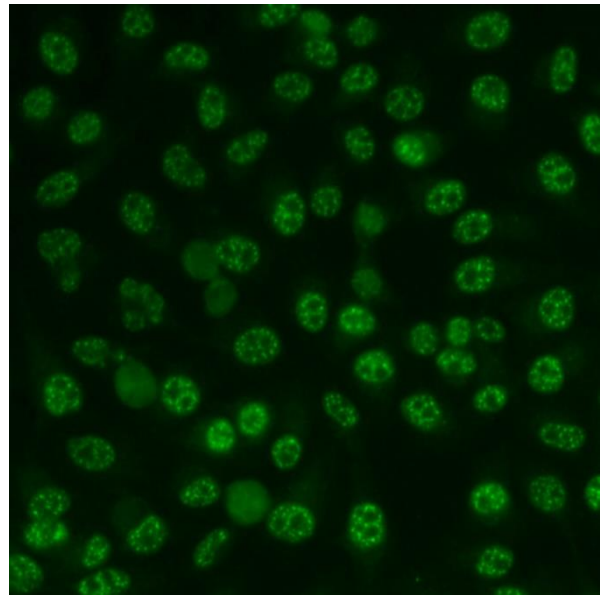


Abb. 16: Helios[®]: Pat D, granuläres Muster

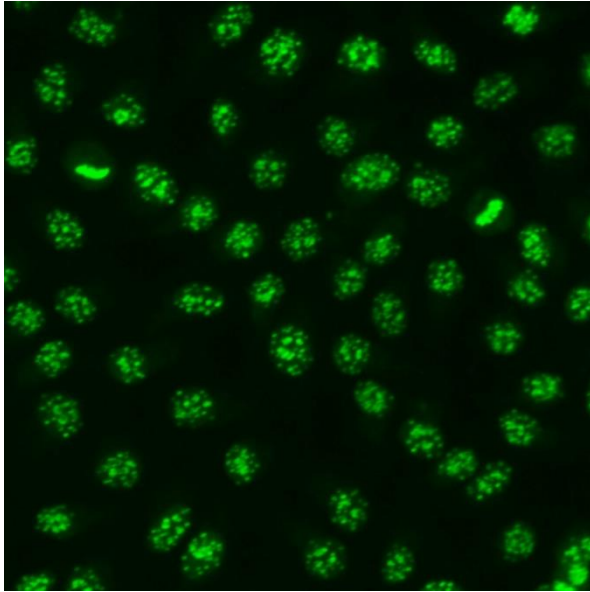


Abb. 17: Helios®: Pat. E, Centromer-Muster bei syst. Sklerose

3.2. Ergebnisse ANCA

3.2.1 visuelle Mikroskopie

c-ANCA

Mittels visueller Mikroskopie wurden 44 Seren positiv und fünf Seren negativ bzgl. c-ANCA bewertet.

p-ANCA

Bezogen auf p-ANCA wurden von 46 Proben 41 positiv und fünf negativ beurteilt.

Kontrollgruppe

In der Bewertung anhand der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden alle 50 Spenderseren als negativ bezüglich c- und p-ANCA identifiziert.

3.2.2 Helios®

Gesamtkollektiv ANCA

Bei gemeinsamer Betrachtung der Testergebnisse von vorselektierten Patientenseren und Spendern ergaben sich 82% für die Sensitivität und 93% für die Spezifität (Tab. 15). Die Korrekturklassifikationsrate belief sich auf 87%. Die falsch positiv Rate belief sich auf 3%, die falsch negativ Rate auf 10%. Da es sich um eine vorselektierte Gruppe handelte, stellten positiver und negativer prädiktiver Wert keine zulässigen Parameter dar. Stattdessen wurde die positive und negative Likelihood Ratio berechnet. LR+ betrug 11,71, welche eine überzeugende

diagnostische Evidenz beschreibt [104]. Für LR- wurde ein Wert von 0,19 bestimmt, welcher eine hohe diagnostische Evidenz darstellt. Die statistische Auswertung der Interrater-Reliabilität ergab gute Übereinstimmung (Kappa = 0,737, $p < 0,001$) [107]. Der Kontingenzkoeffizient nach Pearson lag mit 0,598, ($p < 0,001$) auf der Grenze von mäßiger zu guter Übereinstimmung (siehe Tab. 8).

Tab. 15: Helios[®]: Kontingenztabelle des ANCA-Gesamtkollektivs

ANCA-Gesamtkollektiv	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios [®] : positiv	70 (48%)	4 (3%)	74	LR+:11,71
Helios [®] : negativ	15 (10%)	56 (39%)	71	LR-:0,19
gesamt	85	60	145	
	Sensitivität: 82%	Spezifität: 93%		

c-ANCA und p-ANCA (gemeinsame Auswertung)

Betrachtet man die Patientenseren gemeinsam ergibt sich die in Tab. 16 dargestellte Kontingenztabelle. Die Sensitivität lag bei 82%, die Spezifität bei 60%. Insgesamt wurden 80% der Ergebnisse korrekt klassifiziert, wobei 4% falsch Positive und 16% falsch Negative vorlagen. Die Likelihood-Ratio (LR+ = 2,05, LR- = 0,30) drückte eine schwache diagnostische Evidenz mit nur geringer Zu- bzw. Abnahme der Posttestwahrscheinlichkeit aus (siehe Tab. 4) [104]. Der κ -Wert (0,285, $p = 0,002 > 0,05$) stellte eine signifikante, aber schwache Übereinstimmung mit der Fluoreszenzmikroskopie dar. Auch nach C_p -Wert (0,299, $p = 0,002 > 0,05$) bestand eine schwache Übereinstimmung. Da die erwartete Häufigkeit für eine Zelle < 5 im zugrunde liegenden Chi-Quadrat-Test war, wurde der exakte Test nach Fisher angewandt ($p = 0,007 < 0,05$).

Tab. 16: Helios[®]: Kontingenztabelle von c- und p-ANCA

c- und p-ANCA	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios [®] : positiv	70 (74%)	4 (4%)	74	LR+:2,05
Helios [®] : negativ	15 (16%)	6 (6%)	21	LR-:0,30
gesamt	85	10	95	
	Sensitivität: 82%	Spezifität: 60%		

Repräsentative Aufnahmen von Kontrollproben finden sich in Abb. 18 und Abb. 19.

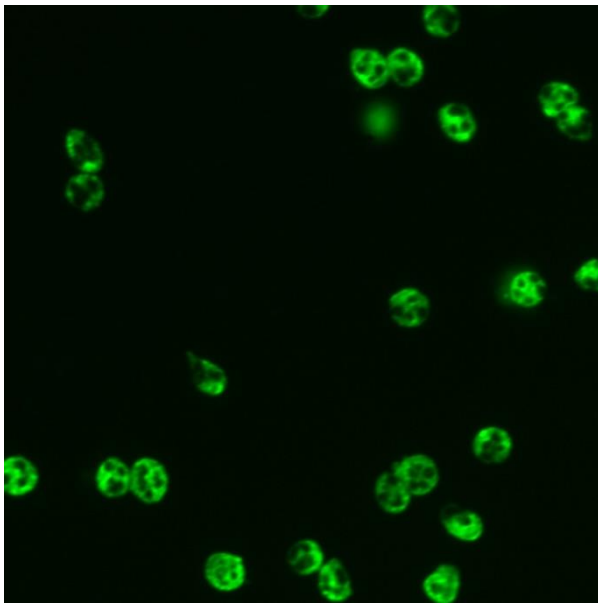


Abb. 18: Helios[®]: Kontrollprobe, c-ANCA

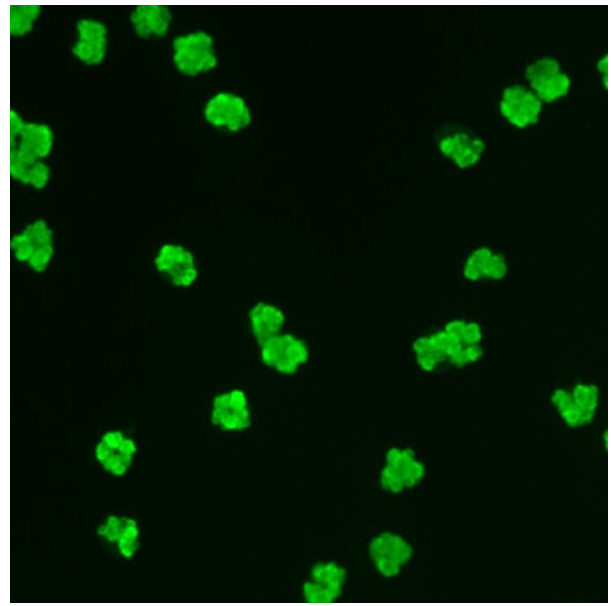


Abb. 19: Helios[®]: Kontrollprobe, p-ANCA

c-ANCA

Wie in Tab. 17 veranschaulicht, erreichte der Helios[®] bei den c-ANCA eine Sensitivität von 80% sowie eine Spezifität von 100% in der Diskrimination positiver und negativer Ergebnisse. In Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzmikroskop lagen 81% der Testergebnisse. Die negative Likelihood Ratio ergab 0,20 und lag damit genau auf der Grenze zwischen mäßiger und schwacher Evidenz zum Ausschluss des Vorliegens von c-ANCA. Die positive Likelihood Ratio war aufgrund der Spezifität von 100% nicht berechenbar (siehe Formel) [104]. Cohens Kappa für die Interrater-Reliabilität belief sich auf 0,442 ($p < 0,001$) und beschrieb so eine mäßige Übereinstimmung [107]. Der Kontingenzkoeffizient nach Pearson ergab mit 0,470 ($p < 0,001$) eine mäßige Übereinstimmung. Allerdings wurde die Voraussetzung für den Chi-Quadrat-Test verletzt, da die erwartete Häufigkeit für zwei Zellen < 5 war. Fishers exakter Test war aber ausreichend signifikant ($p = 0,001 < 0,05$), sodass der Wert des Kontingenzkoeffizienten gültig war.

Tab. 17: Helios[®]: Kontingenztabelle der c-ANCA

c-ANCA	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios [®] : positiv	35 (71%)	0 (0%)	35	LR+: n.b.
Helios [®] : negativ	9 (18%)	5 (10%)	14	LR-: 0,20
gesamt	44	5	49	
	Sensitivität: 80%	Spezifität: 100%		

p-ANCA

In der Unterscheidung positiver und negativer Befunde von p-ANCA wurde eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 20% ermittelt. Die Korrekturklassifikationsrate belief sich auf 78%. Die positive Likelihood Ratio ergab 1,06 und drückte so eine minimale Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von p-ANCA bei positivem Testergebnis aus. Die negative Likelihood Ratio war 0,75 und beschrieb so eine minimale Abnahme der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von p-ANCA bei negativem Testergebnis [104]. Der Kappa-Wert betrug sich auf 0,046 ($p = 0,752$) und bezeichnete damit eine schlechte Übereinstimmung ohne ausreichende Signifikanz [107]. Pearsons Kontingenzkoeffizient nahm die gleichen Werte an: 0,046 ($p = 0,752$) und sprach für eine schlechte Übereinstimmung. Die Voraussetzungen für den Chi-Quadrat-Test wurden verletzt, da in zwei Zellen die erwartete Häufigkeit < 5 war. Auch Fishers exakter Test war nicht signifikant ($p = 1$).

Tab. 18: Helios[®]: Kontingenztabelle der p-ANCA

p-ANCA	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt	
Helios [®] : positiv	35 (76%)	4 (9%)	39	LR+: 1,06
Helios [®] : negativ	6 (13%)	1 (2%)	7	LR-: 0,75
gesamt	41	5	46	
	Sensitivität: 85%	Spezifität: 20%		

Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe der gesunden Blutspender wurden alle 50 Seren von Helios[®] richtig negativ klassifiziert. Daher lagen die Spezifität und die prozentuale Übereinstimmung bei 100%, wobei die Sensitivität nicht berechenbar war. Weitere Parameter wurden aufgrund mangelnder Aussagekraft nicht berechnet.

Tab. 19: Helios[®]: Kontingenztafel der ANCA-Kontrollgruppe

ANCA-Kontrollgruppe	visuelle IIF: positiv	visuelle IIF: negativ	gesamt
Helios [®] : positiv	0 (0%)	0 (0%)	0
Helios [®] : negativ	0 (0%)	50 (100%)	50
gesamt	0	50	50
	Sensitivität: n.b.	Spezifität: 100%	

3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. 20: Tabellarische Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Ergebnisgruppe	Sensitivität	Spezifität	κ -Wert	C_p -Wert
Aklides [®] ANA Gesamtkollektiv	89%	59%	0,494	0,457
Aklides [®] ANA Stichprobe	81%	71%	0,521	0,463
Aklides [®] ANA Subgruppe RE	84%	71%	n.b.	n.b.
Aklides [®] ANA Subgruppe NRE	40%	71%	n.b.	n.b.
Aklides [®] ANA Subgruppe DK	100%	n.b.	n.b.	n.b.
Helios [®] ANA Gesamtkollektiv	87%	54%	0,415	0,399
Helios [®] ANA Stichprobe	87%	54%	0,407	0,399
Helios [®] ANA Subgruppe RE	90%	44%	n.b.	n.b.
Helios [®] ANA Subgruppe NRE	80%	71%	n.b.	n.b.
Helios [®] ANA Subgruppe DK	100%	n.b.	n.b.	n.b.
Helios [®] ANCA Gesamtkollektiv	82%	93%	0,737	0,598
Helios [®] ANCA Patienten	82%	60%	0,285	0,299
Helios [®] c-ANCA	80%	100%	0,442	0,470
Helios [®] p-ANCA	85%	20%	0,046	0,046

4 Diskussion

Für das Screening auf Kollagenosen und Vaskulitiden ist der visuelle IIFT auf ANA und ANCA weitgehend etabliert. Diese Methode ist jedoch aufgrund ihrer Subjektivität mit einigen Nachteilen behaftet. Um diese zu überwinden und den Grad der Standardisierung zu erhöhen, wurden verschiedene automatisierte Bewertungssysteme entwickelt. In vorläufigen Studien haben sich diese Automaten als vielversprechend erwiesen und Hoffnungen geweckt, kosteneffizient und standardisiert eine große Anzahl von IIFT durchführen zu können.

Darauf eingehend wurden in der vorliegenden Arbeit zwei dieser Automaten, Aklides[®] und Helios[®], hinsichtlich ihrer Reliabilität in der Routinediagnostik von 1008 Patientenseren und 145 präselektierten Seren überprüft. Die Ergebnisse wichen deutlich von denen in der Literatur ab, mit den wesentlichen Resultaten der Fragestellung:

- I) mäßige Interrater-Reliabilität beider Automaten bzgl. der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA mit der visuellen IIF,
- IIa) korrekte Mustererkennung in weniger als der Hälfte der Fälle sowie
- IIb) eine gute Korrelation von Titer und Lichtintensität, jedoch ohne der Fähigkeit von einer verlässlichen Endtitervorbestimmung bei Aklides[®]
- III) mäßige bis schlechte Interrater-Reliabilität von Helios[®] bzgl. der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANCA mit der visuellen IIF.

Aus diesen Ergebnissen resultieren folgende Fragen, die im Anschluss diskutiert werden sollen: Was bedeuten die Ergebnisse im Bezug auf die Verlässlichkeit und Nützlichkeit der IIF-Prozessoren im Einsatz in der Routinediagnostik? Wie lassen sich die Diskrepanzen der Ergebnisse zu den Werten in der Literatur erklären?

4.1 Methodik

4.1.1 Patienten

Gesamtkollektiv ANA

Die weibliche Dominanz (62%) sowie das gehobene Alter ($50,2 \pm 19,5$ Jahre) passen zu dem Verdacht auf rheumatische Erkrankungen, respektive Kollagenosen. Im Vergleich mit ähnlichen Studien wurde eine sehr hohe Anzahl ($n = 1008$) an Seren überprüft. Während Bizzaro et al. ($n = 126$) und Shovman et al. ($n = 426$) deutlich kleinere Kohorten getestet haben, untersuchten Egerer et al. ($n = 1222$) eine noch größere Anzahl [82, 84, 91]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zu einigen anderen Studien liegt im Studiendesign. Während in dieser Studie konsekutive Seren von multiplen Einsendern ohne weitere Präselektion verwendet wurden, waren in anderen Studien ausschließlich oder zum großen Teil präselektierte Seren Testgegenstand. Neben Positivität bzw. Negativität waren auch eindeutige, nicht gemischte Fluoreszenzmuster Auswahlkriterium, was aber nicht dem Normalfall entspricht. Es wurde also das theoretische Leistungsvermögen der entsprechenden Geräte getestet, aber nicht ihr konkretes Leistungsvermögen unter wirklichen Arbeitsbedingungen eines Autoimmunlabors. Dies war in dieser Studie gegeben. Dennoch wären für den Vergleich innerhalb der Studie sowie mit anderen Veröffentlichungen weitere Gruppen mit gesunden Spendern sowie Patienten mit Kollagenosen und hohen ANA-Titern hilfreich gewesen.

Gesamtkollektiv ANCA

Das mittlere Alter ($55,9 \pm 18,2$ Jahre) und das ausgeglichene Geschlechterverhältnis ($w = 55\%$) stehen im Einklang mit der Epidemiologie der systemischen Vaskulitiden [49, 56, 64]. Die Kontrollgruppe der gesunden Spender ist deutlich jünger ($34,9$ Jahren $\pm 11,9$) und es besteht eine männliche Dominanz. Daraus lassen sich für die Arbeit aber keine wesentlichen Rückschlüsse ziehen. Da es sich bei der automatisierten Bestimmung von ANCA um ein neueres, weniger etabliertes Verfahren handelt und ANCA-IIFTs weniger häufig angefordert werden, wurden präselektierte Seren verwendet. Die Anzahl der Proben ($n = 145$) entspricht in etwa der von Shovman et al. ($n = 170$), wobei dort auch Seren aus der Routinediagnostik eingeflossen sind. Insgesamt ist die Anzahl der untersuchten Seren gering, daher sollten in weiteren Studien größere Kollektive mit gesunden Probanden, gut definierten Erkrankten und Seren aus der Routinediagnostik untersucht werden.

4.1.2 Methodik

IIF mit visueller Mikroskopie

Die Vorbereitung der Objektträger für ANA wurde mit Helmed[®], die Bestimmung von Positivität, Muster und Titer von Experten durchgeführt. Für ANCA wurde neben der Bestimmung auch die Vorbereitung manuell durchgeführt.

Das Verfahren der visuellen IIF ist teilweise subjektiv und kann zu Variabilität führen, was besonders für nicht spezialisierte Labore und unerfahrenes Personal ein Problem darstellen kann. Es muss aber festgestellt werden, dass es sich bei den Experten dieser Studie um Mitarbeiter des Speziallabors für Autoimmundiagnostik mit jahre- bis jahrzehntelanger Erfahrung im Bereich der IIF handelt [84].

Sowohl für ANA als auch für ANCA wurden Testkits der Firma Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Deutschland verwendet. Dabei handelt es sich um die Herstellerfirma von Helmed[®] und Helios[®], sodass eine optimale Abstimmung gewährleistet werden konnte. Abhängig von der herstellerspezifischen Testdurchführung (Verdünnungen, Inkubationszeiten, Waschvorgänge) und den verwendeten Testsubstanzen (Substrate, Pufferlösungen, Konjugate) können Resultatabweichungen trotzdem nicht komplett ausgeschlossen werden.

Von großer Bedeutung bei der IIF ist die Qualität der Substrate. Bisher gibt es keine standardisierte Vorbereitung der Zellsubstrate sowie der Zusammensetzung der Testkits unter den verschiedenen Herstellern. Diese ist allerdings notwendig, um Ergebnisse unterschiedlicher Testkits bzw. Labore vergleichen zu können [76].

Der Vollständigkeit halber soll auch auf die Abhängigkeit von korrekter Präanalytik hingewiesen werden (Probengewinnung, -versand, -lagerung, Zentrifugation, Pipettierverhalten).

IIF mit automatisierten Prozessoren

Die Automatisierung der IIF ist ein relativ neues Feld in der Labordiagnostik. Während die Automatisierung der Testvorbereitung und Pipettiervorgänge schon länger etabliert ist, befindet sich die automatisierte Bestimmung des IIFT aktuell noch in einer Entwicklungsphase.

Die Stärken dieser Automaten liegen im Bereich der Positiv-Negativ-Diskrimination, wohingegen die Titerbestimmung und besonders die Mustererkennung nach wie vor eine Herausforderung darstellt. Dies liegt in der grundlegenden Technik dieser Automaten begründet. Insbesondere die Lichtintensität spielt für die Positiv-Negativ-Diskrimination eine Rolle. Diese ist abhängig von der AAK-Konzentration, also der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration, sowie dem entsprechenden Fluoreszenzmuster. Daher werden hochtritige Seren besser als niedrigtritige Seren erkannt. Flächige Muster wie das homogene werden besser als punktuelle Muster wie das

nukleoläre erkannt. Hochtitrige cytoplasmatische AK sowie Artefakte können z.T. nicht von nukleären Mustern unterschieden werden. Aklides[®] lag lediglich in ca. 50% der Musterbestimmungen richtig. Helios[®] verzichtet auf diese Funktion und präsentiert dem Benutzer lediglich ein Bild für die Bewertung des Musters. Problematisch ist außerdem das gleichzeitige Auftreten von verschiedenen AAK und damit auch Mustern. Diese können sich überlagern, sodass sie erst bei höheren Verdünnungsstufen differenziert werden können. Wie in vielen Bereichen der Wissenschaft lässt sich erkennen, dass die künstliche Intelligenz im Bereich der Mustererkennung die menschliche Bewertung nur schrittweise ablöst.

Die mit Aklides[®] gemessenen Intensitäten korrelierten in gutem Maße mit den visuell bestimmten Titern. Helios[®] gibt diese Werte nicht aus. Dennoch waren die Intensitäten wegen ihrer Streuung nicht geeignet, den Titer verlässlich vorherzusagen. Es wird jedoch diskutiert, ob Intensitätswerte nicht langfristig Titer als Maß für die AAK-Konzentration ablösen werden. Der Vorteil würde hauptsächlich darin liegen, dass es sich um stetige Werte handelt und dass weitere Verdünnungsreihen obsolet würden. Als Vorbedingung gilt allerdings eine sehr verlässliche Mustererkennung. Die Intensitätswerte müssten außerdem auf die zugrundeliegenden Muster normiert sein.

Hervorzuheben ist, dass es sich bei Helios[®] um den ersten vollautomatisierten IIF-Prozessor handelt, der sowohl die Vorbereitung als auch die ANA/ANCA-Bestimmung durchführt. So können Arbeitsabläufe im Labor flexibler und effizienter gestaltet werden. Das Aklides[®]-System ist halbautomatisiert und bestimmt ANA auf vorbereiteten Objektträgern. Die Aufrüstung von Aklides[®] für ANCA-Bestimmungen ist Prozess jüngster Entwicklungen.

Bei Auswertung, Diskussion und Verallgemeinerung der Ergebnisse ist stets zu beachten, dass gewisse Größen und Parameter immer einen Einfluss haben werden. Dazu zählen die verwendeten Testkits, darunter insbesondere die Qualität der Zellsubstrate, Puffer und Konjugate. Weiterhin können die installierten Softwareversionen aktualisiert werden. Einer der einflussreichsten Faktoren besteht in der Möglichkeit, den Cut-off-Wert nach den Bedürfnissen des Labors einzustellen. Dadurch kann die Sensitivität und Spezifität an die zu erwartenden Prävalenzen der jeweiligen Patientenkollektive angepasst werden.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 ANA

Diskussion Ergebnisse für ANA in der visuelle Mikroskopie

Gesamtkollektiv

Bei einem Referenzbereich mit einem Titer von $<1:160$ wurden in der Routinediagnostik mit der visuellen IIF 53% der Seren positiv und 47% negativ klassifiziert. In der Literatur schwanken die Werte für die Prävalenz von ANA in der Routinediagnostik recht stark: Bei einem Referenzbereich $<1:80$ bestimmten Egerer et al. 75% positive Seren in einem Universitätslabor, wobei 60% auf Seren mit Titern von $1:80-1:160$ und 15% auf höhere Titer zurückzuführen waren. In der gleichen Studie wurden lediglich 31% positive Seren bei einem privaten Labor bestimmt. Dabei waren 15% $>1:160$ und 16% $1:80-1:160$ [84]. Melegari et al. hingegen klassifizierten bei gleichem Referenzwert lediglich 33% der Seren als positiv [90]. Voigt et al. nutzten einen Referenzbereich von $<1:100$ und klassifizierten 97% der Seren als positiv [88]. Da ein negativer Zusammenhang zwischen Titerhöhe und Prävalenz von ANA besteht, lässt sich vermuten, dass die höheren ANA-Prävalenzen der anderen Studien größtenteils durch niedrigtitrige Seren zustande kommen. Neben dem gewählten Referenzbereich, wird vor allem die Qualifikation der Einsender, klinische Symptome richtig einzuschätzen und somit die Prätestwahrscheinlichkeit zu erhöhen, die Prävalenz maßgeblich beeinflussen.

Der negative Zusammenhang von Höhe des Titers und Anzahl der Seren steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Tan et al [97].

Stichprobe und Subgruppen

Die Übereinstimmung der Werte (Positiv-Negativ-, Titer-, Musterverteilung) der Stichprobe von 118 Patienten mit denen des Gesamtkollektivs zeigen, dass es sich um eine geeignete Stichprobe handelt.

Im Vergleich der Subgruppen von rheumatisch und nicht rheumatisch Erkrankten wird die höhere Prävalenz von ANA (59% zu 26%) sowie deren höhere Titer deutlich. Der wissenschaftlich etablierte Zusammenhang von ANA und rheumatischen Erkrankungen wird hier erneut bestätigt.

Die Subgruppe mit ANA als Diagnosekriterium war in 100% der Fälle ANA-positiv mit überdurchschnittlich hohen Titern. Hohe ANA-Titer bei Kollagenosen sind seit Langem bekannt und waren Grundlage dieser Studie, die an dieser Stelle nochmals bestätigt wurden. Aus der Darstellung der Sensitivitäten und Spezifitäten für Kollagenosen in Abhängigkeit von der Höhe des ANA-Titers lassen sich zwei wichtige Erkenntnisse ziehen. Zum einen würde eine

Erhöhung des Referenzbereiches auf 1:320 oder sogar 1:640 zwar eine günstige Kombination aus Sensitivität und Spezifität ermöglichen, allerdings würde man in Kauf nehmen, Kollagenosen zu übersehen. Zum anderen sind sehr hohe Titer ($> 1:1280$) in hohem Maße spezifisch für Kollagenosen.

Die Literaturwerte für die Verteilung der einzelnen Muster weisen insgesamt ein großes Spektrum auf. In ihrer zentralen Tendenz zeigen die Werte der vorliegenden Arbeit Übereinstimmungen mit ihnen. Die Literaturwerte beziehen sich meist auf den prozentualen Anteil der Muster innerhalb der positiven Proben. Da sich die Prozentsätze der Musterverteilung aus Tab. 9 auf positive und negative Seren beziehen, müssen sie entsprechend ihrem Anteil innerhalb der positiven Muster mit einem Faktor von 1,89 (53% positive Muster) multipliziert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Centromere liegen mit 2% sehr nah an den Literaturwerten von 3-5%. Innerhalb der granulären Muster (A2, A4, A5 der Konsensusnomenklatur [100]) gibt es erhebliche Schwankungen. In dieser Arbeit machen granuläre Muster aller Subtypen 68% aus, wobei die Literaturwerte 20%-60% betragen. Während sich in der Literatur ein Spektrum von 4%-37% für homogene Muster findet, wurden in dieser Studie 19% homogene Muster festgestellt. Die nukleolären Muster befinden sich mit 10% leicht unterhalb des Spektrums von 11-18%. Nukleäre Dots und nuclear envelope wurden wie in dieser Studie mit ca. 1% angegeben. Einschränkend muss erwähnt werden, dass sich die zugrundeliegenden Studien in Design, Referenzwerten, Umfang, Region und der Einteilung von gemischten Mustern unterscheiden [114-116].

Diskussion der Ergebnisse für ANA bei Aklides[®]

Gesamtkollektiv Aklides[®]

Die im Gesamtkollektiv bestimmten Werte Sensitivität (89%), Spezifität (59%), der mäßige Grad der Übereinstimmung ($\kappa = 0,494$; $C_p = 0,457$) und die Korrektklassifikationsrate (75%) sind deutlich niedriger als die Werte in vergleichbaren Untersuchungen. Auch der PPW (71%) und der NPW (83%) sind klein für einen diagnostischen Screeningtest. Egerer et al. bestimmten in ihrer Studie für den Aklides[®] deutlich höhere Werte mit $\kappa = 0,828$, $C_p = 0,646$ und einer Korrektklassifikationsrate von 93%. Bizzaro et al. identifizierten eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 85% für die Positiv-Negativ-Diskrimination des Aklides[®].

Die Hauptursachen für die Diskrepanz sind vermutlich der unterschiedliche Studienaufbau, die Einteilung der Ergebnisse sowie die verschiedenen Referenzbereiche der Labore. Während Bizzaro et al. präselektierte Seren verwendeten, wurden in dieser Studie konsekutive Patientenserum im Rahmen von Routinediagnostik untersucht. Bei Bizzaro et al. wurden die

präselektierten Seren hinsichtlich ihres eindeutigen Musters und hohen Titers ausgesucht. Im untersuchten Patientenkollektiv der vorliegenden Studie bildeten aber negative und schwach positive Seren den Großteil (siehe Abb. 2). Auch kamen hauptsächlich gemischte Muster vor. Bei der Differenzierung zwischen negativen und schwach positiven Seren sowie gemischten Mustern, bestanden jedoch die größten Schwierigkeiten, besonders für die Automaten. Egerer et al. verwendeten eine andere Einteilung der Ergebnisse, so wurde in negativ, schwach positiv und positiv eingeteilt [82, 84].

Auch Melegari et al. bestimmten eine deutlich höhere Korrektklassifikationsrate von 91% und nutzten dafür ein gemischtes Patientenkollektiv aus Routineproben und präselektierten positiven Seren. Hier konnte allerdings gezeigt werden, dass die Korrektklassifikationsrate innerhalb der Routinediagnostik 5% kleiner war als bei den präselektierten Seren [90].

Einer der wichtigsten Faktoren für die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Studie zu anderen Studien ist zweifellos der verwendete Referenzbereich von $<1:160$ anstatt $<1:80$.

Das wichtigste Charakteristikum zur Bewertung eines Screening Tests hängt von den Implikationen ab, die sich aus einem falschen Ergebnis ableiten. Während ein falsch positives Ergebnis den Verdacht auf eine nicht existierende Erkrankung erzeugt, kann ein falsch negatives Ergebnis zum Übersehen einer Erkrankung führen.

Knapp die Hälfte aller falsch Positiven hatte ein cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster. Dies macht offensichtlich, dass Aklides[®] bei der Differenzierung von nukleären zu cytoplasmatischen Fluoreszenzmustern Schwächen hat. Die Kernkompetenz von Aklides[®] liegt in der Positiv-Negativ-Diskrimination, daher werden bei Positivität Titer und Muster visuell überprüft. Dort kann dann festgestellt werden, ob tatsächlich ANA, welcher Titer und welches Fluoreszenzmuster vorliegen. Im Arbeitsablauf des Labors ist die negative Konsequenz eines falsch positiven Ergebnisses eines IIF-Prozessors daher lediglich ein erhöhter Arbeitsaufwand und keine folgenreiche Fehldiagnostik für den Patienten. Das Gerät hat die Aufgabe negative Seren auszusortieren. Im Sinne einer zeit- und kosteneffizienten Arbeitsweise ist eine Spezifität von 59% aber ein unbefriedigender Zustand, der weiterer Optimierung bedarf.

Die Sensitivität ist direkt abhängig von den falsch positiven Ergebnissen. Der Anspruch an einen Screeningtest ist es, eine sehr hohe Sensitivität aufzuweisen. Diese ist mit 89% hoch, jedoch nicht sehr hoch. Hier ist eine differenzierte Betrachtungsweise notwendig. Von den 57 falsch negativen Ergebnissen haben 56 einen schwach positiven Titer (1:160) und nur ein Ergebnis einen stark positiven Titer (1:320). Dieser stellte sich in der visuellen Nachkontrolle als negativ heraus. Auch wenn der Referenzbereich des Labors bei Titern $\geq 1:160$ liegt, wird erst bei Titern $\geq 1:320$ von einer klaren klinischen Relevanz ausgegangen. Betrachtet man ausschließlich die

stark positiven Titer ($\geq 1:320$) werden 165/166 Seren richtig positiv bewertet, was einer Sensitivität von 99% entspricht. Aus klinisch diagnostischer Sicht ist dies ein mehr als zufriedenstellendes Ergebnis. Die unterschiedliche Verteilung der Muster unter den falsch Negativen von der Verteilung der Muster unter den visuell positiv bestimmten Seren lässt vermuten, dass Aklides[®] bestimmte Muster besser als positiv bewerten kann. Nukleäre Dots, nuclear envelope und Centromere wurden nicht falsch negativ klassifiziert. Dies liegt vermutlich an den relativ hohen Titern, die sie aufwiesen. Da homogene Fluoreszenzmuster verhältnismäßig seltener falsch negativ klassifiziert wurden, scheinen sie für Aklides[®] besser erkennbar zu sein als feingranuläre, granuläre und nukleoläre Muster.

Spearman's Rangkorrelationskoeffizient zeigte mit 0,680 (KI: 0,646-0,711) eine starke Korrelation zwischen Intensität des Lichtsignals und Höhe des Titers. Bizzaro et al. errechneten mit 0,672 (KI: 0,560–0,760) sehr ähnliche Werte. Wie in Abb. 6 ersichtlich gab es allerdings starke Ausreißer, die eine verlässliche, konkrete Vorhersage der Titerhöhe unmöglich machen. Die angegebenen Intensitäten können aber eine Tendenz für die Titerklasse sein und zum Ansetzten der Verdünnungsreihen genutzt werden.

Der in der ROC-Analyse bestimmte AUC-Wert von 0,851 (0,827-0,875) war kleiner als der von Bizarro et al. bestimmten AUC-Wert von 0,952 (0,899-0,982). Dies steht im Einklang mit den oben beschriebenen unterschiedlichen Graden der Übereinstimmung der Ergebnisse. Dennoch zeigt sich, dass es sich bei Aklides[®] um eine Methode mit guter Trennschärfe zur Bestimmung von ANA handelt. Der Youden-Index für den optimalen Cut-off Wert lag mit 165 ziemlich hoch und deutlich über dem verwendeten Cut-off Wert von 100. Grund dafür ist, dass der Youden-Index Sensitivität und Spezifität gleichwertig einstuft, was bei einem Screeningtest nicht adäquat ist. So gäbe es 122 falsch negative Seren, inklusive 11 Seren mit einem Titer $\geq 1:320$, was inakzeptabel wäre. Da es bei einem Cut-off-Wert von 120 bereits 72 falsch negative Testergebnisse gäbe, ist zu vermuten, dass der tatsächlich optimale Cut-off-Wert zwischen 100 und 120 liegt.

Stichprobe und Subgruppen Aklides[®]

Die in der Stichprobe ermittelten Werte waren denen des Gesamtkollektivs sehr ähnlich. Während Sensitivität (81%) und Spezifität (71%) kleinere Abweichungen aufwiesen, waren die Maße zur Übereinstimmung ($\kappa = 0,521$; $C_p = 0,463$), die Korrekturklassifikationsrate (76%), PPW (76%) und NPW (76%) fast identisch. Man kann also von einer repräsentativen Stichprobe ausgehen. Die besseren Werte (Sensitivität = 84%, Spezifität = 71%) in der Gruppe der rheumatisch Erkrankten gegenüber der Gruppe der nicht rheumatisch Erkrankten (Sensitivität =

40%, Spezifität = 71%) liegen wohl an den höheren und damit leichter erkennbaren ANA-Titern und einhergehenden höheren Intensitäten. Außerdem kann die kleinere Gruppenzahl der nicht rheumatisch Erkrankten Schwankungen verursacht haben. In der Subgruppe Diagnosekriterium wurden alle Seren korrekt positiv eingestuft. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass Aklides[®] ANA in Seren mit höheren Titern, von Erkrankten und insbesondere von Erkrankten der Diagnosekriteriumsgruppe sehr verlässlich bestimmen kann. In erster Linie wird dies mit den höheren Intensitäten zusammenhängen, die in diesen Gruppen vorkommen. Klinisch gesehen ist diese Aussage äußerst relevant, da bei betroffenen Patientengruppen die Verlässlichkeit des Geräts besonders hoch ist.

Es wurden lediglich 43% der ANA-Muster korrekt bestimmt, während in der Studie von Bizzaro et al. vergleichbare 52% der ANA-Muster richtig erkannt wurden [82]. Weil in mehr als der Hälfte der Fälle das Muster nicht richtig erkannt wird, ist die Mustererkennung in der aktuellen Form keine verlässliche Funktion von Aklides[®].

Diskussion der Ergebnisse für ANA bei Helios[®]

Gesamtkollektiv Helios[®]

Die Werte für Sensitivität (87%), Spezifität (54%), Korrektklassifikationsrate (71%), PPW (68%), NPW (79%) und die Maße der Übereinstimmung ($\kappa = 0,415$; $C_p = 0,399$) sind etwas kleiner als die entsprechenden Werte von Aklides[®] und deutlich kleiner als die Daten aus vergleichbaren Studien. Shovman et al. berechneten als Maß für die Übereinstimmung von visueller und maschineller ANA-Bestimmung einen Kappa-Wert 0,633 für positive Seren und einen Kappa-Wert von 0,657 für negative Werte. Bizzaro et al. bestimmten in ihrer Vergleichsstudie eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 94% für Helios[®]. In ihrer Übersichtsarbeit ermittelten Tozzoli et al. eine Korrektklassifikationsrate von 98% für die Positiv-Negativ-Diskrimination [82, 83, 91].

Einer der wichtigsten Gründe für diese Diskrepanz wird im unterschiedlichen Studiendesign liegen. Bizzaro et al nutzten ausschließlich nach Diagnose, Muster und Titer präselektierte Seren, zusätzlich war ein Großteil der untersuchten Seren positiv und nur ein kleinerer Teil von gesunden Blutspendern. In diesem Patientenkollektiv ist es wesentlich einfacher, zwischen positiven und negativen Seren zu diskriminieren. Shovman et al. nutzten sowohl ein Patientenkollektiv mit präselektierten Seren als auch Seren aus der Routinediagnostik. Die detaillierten Inhalte der entsprechenden Kontingenztabelle wurden nicht beschrieben. Gerade der Vergleich von präselektierten Seren zu denen aus der Routinediagnostik wäre aber interessant gewesen. Besonders im Vergleich zu der Studie von Shovman et al. lässt sich die Diskrepanz der

Ergebnisse nicht ausreichend erklären. In der Studie von Tozzoli et al. wird nur die Korrekturklassifikationsrate als Ergebnis beschrieben, sodass ein detaillierterer Vergleich nicht möglich ist.

Wie für den Aklides[®] bereits diskutiert, bedeutet eine geringe Spezifität für einen zweistufigen Ansatz mit Screening- und Bestätigungstest in erster Linie einen höheren Zeit- und Kostenaufwand als negative Konsequenzen für Patienten. Dennoch ist eine Spezifität von 54% nicht zufriedenstellend und eine Hürde für das Ziel der Standardisierung. In ca. einem Drittel der falsch Positiven wurden cytoplasmatische Fluoreszenzmuster festgestellt, daher lässt sich vermuten, dass die Bilderkennungssoftware Schwierigkeiten hat, zwischen cytoplasmatischer und nukleärer Lokalisation zu differenzieren.

Die Sensitivität ist mit 87% ausreichend, aber nicht optimal. Da im Bereich stark positiver Werte ($\geq 1:320$) aber eine 99%ige Sensitivität besteht, handelt es sich bei Helios[®] um eine verlässliche Methode zum Screening auf ANA. Bei den falsch Negativen handelte es sich in 68/69 Fällen um einen schwach positiven Titer (1:160). Der stark positive Titer (1:320) stellte sich in der visuellen Nachkontrolle als negativ heraus. Im Vergleich der Musterverteilung aller visuell positiv bestimmten Seren mit der Musterverteilung innerhalb der falsch Negativen konnten verhältnismäßige Unterschiede festgestellt werden. Während nukleäre Dots, nuclear envelope und Centromere nicht falsch negativ klassifiziert wurden, hatten feingranuläre, granuläre und insbesondere nukleoläre Muster einen erhöhten Anteil unter den falsch Negativen. Das lässt darauf schließen, dass diese Muster für Helios[®] schwerer zu identifizieren sind. Da homogene Muster einen deutlich geringeren Anteil hatten, scheinen sie leichter erkannt werden zu können.

Stichprobe und Subgruppen Helios[®]

Die Sensitivität (87%), Spezifität (54%), Korrekturklassifikationsrate (71%), PPW (67%), NPW (80%) und die Maße der Übereinstimmung ($\kappa = 0,407$; $C_p = 0,399$) der Stichprobe waren mit denen des Gesamtkollektivs nahezu identisch. Es kann daher von einer geeigneten Stichprobe ausgegangen werden. Während in der Gruppe der rheumatisch Erkrankten die Sensitivität mit 90% höher war, als bei den nicht rheumatisch Erkrankten mit 80%, war die Spezifität mit 44% deutlich niedriger, als bei den nicht rheumatisch Erkrankten mit 71%. Ein Faktor für die unterschiedlichen Werte sind mit Sicherheit die höheren Titer der Seren der Erkrankten, die leichter zu erkennen sind. Ein weiterer Faktor ist die kleine Gruppengröße ($n = 19$) der nicht rheumatisch Erkrankten, die zu Schwankungen führt. Für die Subgruppe Diagnosekriterium wurde eine Sensitivität von 100% bestimmt. Für den Bereich der Stichprobe und der Subgruppen

lässt sich zusammenfassend sagen, dass Helios[®] im Bereich rheumatisch Erkrankter und besonders bei Patienten, wo ANA Diagnosekriterien sind, sehr verlässlich arbeitet.

4.2.2 ANCA

Diskussion der Ergebnisse bei Helios[®]

Da bisher noch nicht viel Literatur über das ANCA-Screening mit Helios[®] veröffentlicht wurde, lassen sich die Ergebnisse ausschließlich mit der Studie von Shovman et al. vergleichen. Während in der vorliegenden Studie für das Gesamtkollektiv eine Sensitivität von 82%, eine Spezifität von 93%, eine Korrektklassifikationsrate von 87% sowie Maße zur Übereinstimmung ($\kappa = 0,737$; $C_p = 0,598$) ermittelt wurden, gaben Shovman et al. eine Korrektklassifikationsrate von 95-100% und $\kappa = 1,00$ an. Die Diskrepanz der Ergebnisse ist bemerkenswert, da ein ähnlicher Studienaufbau gewählt worden ist. In der vorliegenden Arbeit wurden präselektierte positive sowie negative Seren verwendet, Shovman et al. nutzen zusätzlich dazu auch Seren aus der Routinediagnostik. Bei Betrachtung der einzelnen Subgruppen der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass der vermeintlich gute Wert der Übereinstimmung ($\kappa = 0,737$) nur durch das korrekt negative Klassifizieren der 50 gesunden Blutspender zustande kam. So wurde für c-ANCA eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 100% bei mäßiger Übereinstimmung berechnet ($\kappa = 0,442$; $C_p = 0,470$). Für p-ANCA waren die Werte mit Sensitivität 85%, Spezifität 20% und nicht signifikanten κ - und C_p -Werten noch schlechter. Statistisch gesehen handelte es sich hierbei um ein Zufallsergebnis. So lässt sich vermuten, dass das Fluoreszenzmuster der p-ANCA an sich schwerer durch die Software zu identifizieren ist oder geringere Intensitäten aufweist.

Da es sich bei dem IIFT auf ANCA um einen Screeningtest handelt, ist insbesondere die geringe Sensitivität von 82% ein inakzeptabler Wert. Bei ANCA handelt es sich um einen Parameter mit hoher klinischer Relevanz, sodass falsch negative Ergebnisse Fehldiagnostik und erhebliche negative Konsequenzen für die betroffenen Patienten zur Folge haben würden. Unter diesen Voraussetzungen ist Helios[®] nicht geeignet, um das Screening auf ANCA durchzuführen. Damit sich dies ändert, bedarf es erheblicher Verbesserungen in der Sensitivität und der Erkennung von ANCA.

4.2.3 Limitationen der Studie

Einzelne Limitationen dieser Studie sind in den entsprechenden Kapiteln der Diskussion bereits erwähnt. An dieser Stelle sollen die wesentlichen Kritikpunkte genannt werden.

Obwohl die ANA-Bestimmung beider Geräte mit dem Schwerpunkt von realistischen

Arbeitsbedingungen untersucht wurde, haben umfangreichere Kollektive mit zusätzlichen Kohorten an gesunden Blutspendern und ANA-positiven Patienten eine noch größere Aussagekraft. Außerdem wird die Vergleichbarkeit zu ähnlichen Studien erschwert. Für die ANCA-Bestimmung zeigten sich bereits bei einem gut definierten Kollektiv deutliche Diskrepanzen zur visuellen IIF, sodass für eine weitere Kohorte aus der Routinediagnostik keine Notwendigkeit bestand. Ein größeres Kollektiv ist aber aussagekräftiger, insbesondere, da bei der statistischen Auswertung der Kontingenztabellen der ANCA-Subtypen einzelne Zelleninhalte grenzwertig klein waren.

Die verwendeten ANCA-Seren wurden mit ELISA präselektiert. Trotzdem kam es sowohl bei Helios[®], als auch bei der visuellen Methode zu negativen Ergebnissen. Diese Diskrepanz lässt sich auf die bekannten methodischen Unterschiede von IIF und ELISA zurückführen. Dennoch hat eine Präselektion anhand IIF eine höhere Kohärenz.

Im Versuchsaufbau ist keine Interrater-Beurteilung der visuellen Methode enthalten. Dadurch kann keine Aussage über die Inter- und Intravariabilität der einzelnen Bewerter getroffen werden, welche einen zentralen Kritikpunkt der visuellen IIF darstellt. Eine solcher Ansatz ist notwendig, wenn ein höherer Grad der Standardisierung automatisierter IIF-Prozessoren gezeigt werden soll.

Eine weitere Einschränkung ist, dass nur zwei von sieben kommerziell erhältlichen IIF-Prozessoren getestet wurden. Der Automatisierungsprozess der IIF hat neben medizinischen Aspekten auch ingenieurstechnische und betriebswirtschaftliche Gesichtspunkte, die nicht weiter erörtert wurden.

Grundlegend ist die Allgemeingültigkeit der Ergebnisse durch die verwendeten Patientenkollektive, die Substrate, Puffer und Konjugate der Testkits, den Referenzbereich des Labors, die Erfahrung der visuellen Bewerter und die Einstellungen der Geräte, insbesondere des Cut-off-Wertes, eingeschränkt.

4.2.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zurzeit befinden sich neben Aklides[®] und Helios[®] noch weitere IIF-Prozessoren auf dem Markt: Cytospot[®], EuroPattern[®], Image Navigator[®], Nova View[®], Zenit G-Sight[®]. Deren Werte und besonderen Charakteristika wurden in den Studien von Bizzaro et al. und Tozzoli et al. vergleichend analysiert [82, 83]. Alle diese Geräte vereint, dass sie die Positiv-Negativ-Diskrimination von ANA mittels IIFT anwenden. Sie unterscheiden sich in zusätzlichen Funktionen, wie der ANA-Mustererkennung, der Endtitervorhersage, der Positiv-Negativ-Diskrimination von ANCA bzw. ds-DNA-AK sowie dem Grad der Automatisierung.

In weiteren Veröffentlichungen anderer Autoren wurden die IIF-Prozessoren einzeln untersucht: Knütter et al. analysierten die Erweiterung von Aklides[®] auf das Testen von ANCA und stellten überzeugende Übereinstimmungen für die Positiv-Negativ-Diskrimination fest ($\kappa \geq 0,9$) [89].

Cytospot[®] betreffend liegen aktuell keine Veröffentlichungen vor.

Für EuroPattern[®] wurde von Voigt et al. eine Korrektklassifikationsrate von 99% ($\kappa = 0,984$) mit einer Sensitivität von 100% und Spezifität von 98% bestimmt. Die grundlegenden Fluoreszenzmuster wurden in 94% der Fälle korrekt bestimmt [88]. Von Bizzaro et al. wurde eine Sensitivität von 97%, eine Spezifität von 85% sowie 79% richtig erkannte Muster für EuroPattern[®] beschrieben [82]. Tozzoli et al. errechneten eine Korrektklassifikationsrate von 94% (100% für positive Seren, 74% für negative Seren) [83]. Die Erweiterung des Funktionsbereiches von EuroPattern[®] auf ANCA und dsDNA-AK wurde von Gerlach et al. und Krause et al. diskutiert [117, 118].

In der Studie von Bizzaro et al. erreichte Image Navigator[®] eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 94%. Tozzoli et al. beschrieben lediglich eine hohe Übereinstimmung anhand nicht publizierter Daten [82, 83].

Für Nova View[®] stellten Bizzaro et al. eine Sensitivität und Spezifität von 94% sowie 54% richtig erkannte Fluoreszenzmuster fest [82]. Tozzoli et al. bezifferten eine Korrektklassifikationsrate zwischen 93-100% auf Grundlage von nicht publizierten Daten [3]. In der Studie von Copple et al. beliefen sich die Sensitivität auf 94% und die Spezifität auf 97% [119]. Lakos et al. evaluierten die Funktionserweiterung von Nova View[®] auf die Bestimmung von dsDNA-AK [120].

Bei Zenit G-Sight[®] wurden von Bizzaro et al. eine Sensitivität von 99%, eine Spezifität von 79% sowie 63% korrekt klassifizierte Muster bestimmt [82]. Tozzoli et al. identifizierten eine Korrektklassifikationsrate von 96% auf Grundlage nicht publizierter Daten. Bonroy et al. kamen zu dem Schluss, dass Zenit G-Sight[®] die Positiv-Negativ-Diskrimination und Endtiterbestimmung mit über 90% Genauigkeit beherrscht, die Mustererkennung mit einer Genauigkeit von 26% aber ungenügend ist [87]. In der Studie von Bossuyt et al. wurden eine Korrektklassifikationsrate von 91% und eine mangelhafte Mustererkennung festgestellt [121].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Literaturergebnisse dieser Automaten, ähnlich wie die von Aklides[®] und Helios[®], deutlich besser sind, als die entsprechenden Werte der vorliegenden Arbeit. Die wohl bedeutendsten Gründe, etwa die unterschiedlichen Patientenkollektive und Referenzbereiche, wurden in den Abschnitten zu Helios[®] und Aklides[®] bereits ausführlich diskutiert. Trotzdem lässt sich das Ausmaß der Diskrepanz nicht gänzlich

erklären.

Die Ziele bei der Entwicklung der IIF-Prozessoren sind vielfältig: Standardisierung, Automatisierung, Unabhängigkeit von Experten, Senkung der Variabilität, erhöhter Durchsatz, Senkung der Arbeitsbelastung, Kosteneffizienz, zuverlässigere Positiv-Negativ-Diskrimination, bessere Mustererkennung und Ablösung von Titern durch Fluoreszenzintensitäten.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass bisher nur einige dieser Ziele erreicht worden sind. Die Geräte sind in der Lage, die Positiv-Negativ-Diskrimination für ANA vorzunehmen und sind dabei für klinisch relevante Seren verlässlich. Die bei Aklides[®] angegebenen Intensitätswerte sind ein brauchbares Maß, um Verdünnungsreihen anzusetzen, aber nicht akkurat genug, um den Titer genau vorherzusagen zu können. Der somit erreichte erste Schritt auf dem Weg der vollständigen Automatisierung ermöglicht eine Arbeitserleichterung bzw. einen erhöhten Durchsatz für Labore und dadurch verbesserte Kosteneffizienz.

Um die gesetzten Ziele zu erreichen, bedarf es noch vieler Schritte. Während für Helios[®] der Beweis aussteht, ob der Automat in der Lage ist, ANCA in präselektierte Patientenseren zuverlässig zu erkennen, sind die Automaten beim ANA-Screening bereits einen Schritt weiter. Dort ließen sich Sensitivität und Spezifität besonders dadurch steigern, dass grenzwertige Seren zuverlässig unterschieden werden können. Eine Unabhängigkeit von Experten, die Senkung der Variabilität und letztlich höherer Grad der Standardisierung können erst erreicht werden, wenn die verlässliche Bestimmung von Fluoreszenzmustern möglich ist. Automatisierte Bild- und Mustererkennung ist allerdings eine wissenschaftliche und technische Herausforderung. Speziell die Identifizierung seltener Muster bereitet erhebliche Schwierigkeiten [82].

Aus den positiven Ergebnissen anderer Studien und dem großen Bedarf an diesen Technologien lässt sich schließen, dass die Automaten sukzessive verbessert und Stück für Stück die visuelle Bewertung von IIFTs ablösen werden. Wann das der Fall sein wird, werden weitere klinische Studien, welche die realen Bedingungen der Routinediagnostik und deren Prävalenzen miteinbeziehen, zeigen müssen.

Literaturverzeichnis

- 1 Janeway C, Travers P, Walport M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed: New York: Garland Science; 2001.
- 2 Fritzler MJ. Toward a new autoantibody diagnostic orthodoxy: understanding the bad, good and indifferent. *Auto Immun Highlights*. 2012;3(2):51-8.
- 3 Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):316-24.
- 4 Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Sack U. Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun Rev*. 2012;11(3):207-11.
- 5 Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, Zhong R. Epidemiology of primary Sjogren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(11):1983-9.
- 6 Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2008;37(4):223-35.
- 7 Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):2092-4.
- 8 Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84(3):223-43.
- 9 Nguyen B, Mayes MD, Arnett FC, del Junco D, Reveille JD, Gonzalez EB, Draeger HT, Perry M, Hendiani A, Anand KK, Assassi S. HLA-DRB1*0407 and *1304 are risk factors for scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(2):530-4.
- 10 Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(5):1363-73.
- 11 Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;49(3):399-412.

- 12 Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med. 2000;124(1):71-81.
- 13 Pan LT, Tin SK, Boey ML, Fong KY. The sensitivity and specificity of autoantibodies to the Sm antigen in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Ann Acad Med Singapore. 1998;27(1):21-3.
- 14 Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Medicine (Baltimore). 1993;72(2):113-24.
- 15 Peschken CA, Esdaile JM. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. Semin Arthritis Rheum. 1999;28(6):368-91.
- 16 Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. Lupus. 2006;15(5):308-18.
- 17 Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum. 2010;39(4):257-68.
- 18 Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. Arthritis Rheum. 1998;41(5):778-99.
- 19 Schur P, Massarotti E. Lupus erythematosus: clinical evaluation and treatment. New York: Springer; 2012.
- 20 Podolska MJ, Biermann MH, Maueroeder C, Hahn J, Herrmann M. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. J Inflamm Res. 2015;8:161-71.
- 21 Rovin BH, Tang Y, Sun J, Nagaraja HN, Hackshaw KV, Gray L, Rice R, Birmingham DJ, Yu CY, Spetie DN, Aziz A, Hebert LA. Clinical significance of fever in the systemic lupus erythematosus patient receiving steroid therapy. Kidney Int. 2005;68(2):747-59.
- 22 Greco CM, Rudy TE, Manzi S. Adaptation to chronic pain in systemic lupus erythematosus: applicability of the multidimensional pain inventory. Pain Med. 2003;4(1):39-50.

- 23 Walling HW, Sontheimer RD. Cutaneous lupus erythematosus: issues in diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2009;10(6):365-81.
- 24 Yurkovich M, Vostretsova K, Chen W, Avina-Zubieta JA. Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(4):608-16.
- 25 Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC, Hanly JG, Sanchez-Guerrero J, Clarke A, Aranow C, Manzi S, Urowitz M, Gladman D, Kalunian K, Costner M, Werth VP, Zoma A, Bernatsky S, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Jacobsen S, Buyon JP, Maddison P, Dooley MA, van Vollenhoven RF, Ginzler E, Stoll T, Peschken C, Jorizzo JL, Callen JP, Lim SS, Fessler BJ, Inanc M, Kamen DL, Rahman A, Steinsson K, Franks AG, Jr., Sigler L, Hameed S, Fang H, Pham N, Brey R, Weisman MH, McGwin G, Jr., Magder LS. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.
- 26 Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjogren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(6):796-803.
- 27 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassin SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.
- 28 Steen VD. Clinical manifestations of systemic sclerosis. *Semin Cutan Med Surg*. 1998;17(1):48-54.
- 29 Jacobsen S, Halberg P, Ullman S. Mortality and causes of death of 344 Danish patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Rheumatol*. 1998;37(7):750-5.
- 30 Bohan A, Peter JB, Bowman RL, Pearson CM. Computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine (Baltimore)*. 1977;56(4):255-86.
- 31 Tymms KE, Webb J. Dermatopolymyositis and other connective tissue diseases: a review of 105 cases. *J Rheumatol*. 1985;12(6):1140-8.
- 32 Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Boivin JF, Banerjee D, Clarke AE. Estimating the prevalence of polymyositis and dermatomyositis from administrative data: age, sex and regional differences. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(7):1192-6.

- 33 Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):119-25.
- 34 Airio A, Kautiainen H, Hakala M. Prognosis and mortality of polymyositis and dermatomyositis patients. *Clin Rheumatol.* 2006;25(2):234-9.
- 35 Plotz PH, Rider LG, Targoff IN, Raben N, O'Hanlon TP, Miller FW. NIH conference. Myositis: immunologic contributions to understanding cause, pathogenesis, and therapy. *Ann Intern Med.* 1995;122(9):715-24.
- 36 Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, Miller FW. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore).* 1991;70(6):360-74.
- 37 Shamim EA, Rider LG, Pandey JP, O'Hanlon TP, Jara LJ, Samayoa EA, Burgos-Vargas R, Vazquez-Mellado J, Alcocer-Varela J, Salazar-Paramo M, Kutzbach AG, Malley JD, Targoff IN, Garcia-De la Torre I, Miller FW. Differences in idiopathic inflammatory myopathy phenotypes and genotypes between Mesoamerican Mestizos and North American Caucasians: ethnogeographic influences in the genetics and clinical expression of myositis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1885-93.
- 38 Targoff IN, Johnson AE, Miller FW. Antibody to signal recognition particle in polymyositis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(9):1361-70.
- 39 Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73(4):420-8.
- 40 Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with anti-RNP antibodies. A prospective study of 32 patients. *J Rheumatol.* 1991;18(10):1511-9.
- 41 Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, Wang GS, Johnson JC, Sharp GC. Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):899-909.
- 42 Gunnarsson R, Molberg O, Gilboe IM, Gran JT. The prevalence and incidence of mixed connective tissue disease: a national multicentre survey of Norwegian patients. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):1047-51.
- 43 Cappelli S, Bellando Randone S, Martinovic D, Tamas MM, Pasalic K, Allanore Y, Mosca M, Talarico R, Opris D, Kiss CG, Tausche AK, Cardarelli S, Riccieri V, Koneva O, Cuomo G, Becker MO, Sulli A, Guiducci S, Radic M, Bombardieri S, Aringer M, Cozzi F,

Valesini G, Ananyeva L, Valentini G, Riemekasten G, Cutolo M, Ionescu R, Czirjak L, Damjanov N, Rednic S, Matucci Cerinic M. "To be or not to be," ten years after: evidence for mixed connective tissue disease as a distinct entity. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41(4):589-98.

44 Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med.* 1972;52(2):148-59.

45 Mosca M, Tani C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a new frontier for rheumatology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(6):1011-23.

46 Mosca M, Tani C, Vagnani S, Carli L, Bombardieri S. The diagnosis and classification of undifferentiated connective tissue diseases. *J Autoimmun.* 2014;48-49:50-2.

47 Conrad K, Schöblier W, Hiepe F. Autoantikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen: Ein diagnostischer Leitfaden. 3. ed. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2006.

48 Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CG, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DG, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):1-11.

49 Mahr AD, Neogi T, Merkel PA. Epidemiology of Wegener's granulomatosis: Lessons from descriptive studies and analyses of genetic and environmental risk determinants. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(2 Suppl 41):S82-91.

50 Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, Rottem M, Fauci AS. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med.* 1992;116(6):488-98.

51 Seo P, Stone JH. The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Am J Med.* 2004;117(1):39-50.

52 Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med.* 1997;337(21):1512-23.

53 Gomez-Puerta JA, Hernandez-Rodriguez J, Lopez-Soto A, Bosch X. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides and respiratory disease. *Chest.* 2009;136(4):1101-11.

- 54 Phillip R, Luqmani R. Mortality in systemic vasculitis: a systematic review. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(5 Suppl 51):S94-104.
- 55 Hoffman GS, Specks U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum*. 1998;41(9):1521-37.
- 56 Mahr AD. Epidemiological features of Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: two diseases or one 'anti-neutrophil cytoplasm antibodies-associated vasculitis' entity? *APMIS Suppl*. 2009(127):41-7.
- 57 Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, Bacon P, Tervaert JW, Dadoniene J, Ekstrand A, Gaskin G, Gregorini G, de Groot K, Gross W, Hagen EC, Mirapeix E, Pettersson E, Siegert C, Sinico A, Tesar V, Westman K, Pusey C. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med*. 2003;349(1):36-44.
- 58 Guillevin L, Durand-Gasselin B, Cevallos R, Gayraud M, Lhote F, Callard P, Amouroux J, Casassus P, Jarrousse B. Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum*. 1999;42(3):421-30.
- 59 Szczeklik W, Jakiela B, Adamek D, Musial J. Cutting edge issues in the Churg-Strauss syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(1):39-50.
- 60 Lanham JG, Elkon KB, Pusey CD, Hughes GR. Systemic vasculitis with asthma and eosinophilia: a clinical approach to the Churg-Strauss syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1984;63(2):65-81.
- 61 Guillevin L, Cohen P, Gayraud M, Lhote F, Jarrousse B, Casassus P. Churg-Strauss syndrome. Clinical study and long-term follow-up of 96 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(1):26-37.
- 62 Sinico RA, Bottero P. Churg-Strauss angiitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(3):355-66.
- 63 Churg J, Strauss L. Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *Am J Pathol*. 1951;27(2):277-301.
- 64 Sada KE, Amano K, Uehara R, Yamamura M, Arimura Y, Nakamura Y, Makino H. A nationwide survey on the epidemiology and clinical features of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss) in Japan. *Mod Rheumatol*. 2014;24(4):640-4.

- 65 Harrold LR, Andrade SE, Go AS, Buist AS, Eisner M, Vollmer WM, Chan KA, Frazier EA, Weller PF, Wechsler ME, Yood RA, Davis KJ, Platt R. Incidence of Churg-Strauss syndrome in asthma drug users: a population-based perspective. *J Rheumatol.* 2005;32(6):1076-80.
- 66 Conron M, Beynon HL. Churg-Strauss syndrome. *Thorax.* 2000;55(10):870-7.
- 67 Schwartz RA, Churg J. Churg-Strauss syndrome. *Br J Dermatol.* 1992;127(3):199-204.
- 68 Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Tosoni C, Bottero P, Sabadini E, Giammarresi G, Tumiati B, Gregorini G, Pesci A, Monti S, Balestrieri G, Garini G, Vecchio F, Buzio C. Renal involvement in Churg-Strauss syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(5):770-9.
- 69 Sinico RA, Di Toma L, Maggiore U, Bottero P, Radice A, Tosoni C, Grasselli C, Pavone L, Gregorini G, Monti S, Frassi M, Vecchio F, Corace C, Venegoni E, Buzio C. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2926-35.
- 70 Keogh KA, Specks U. Churg-Strauss syndrome: clinical presentation, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and leukotriene receptor antagonists. *Am J Med.* 2003;115(4):284-90.
- 71 Tervaert JW, Kallenberg CG. Anti-myeloperoxidase antibodies in Churg-Strauss syndrome. *J Neurol.* 1993;240(7):449-50.
- 72 Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK, Rautmann A, Gross WL. ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. *Adv Exp Med Biol.* 1993;336:245-51.
- 73 Sable-Fourtassou R, Cohen P, Mahr A, Pagnoux C, Mouthon L, Jayne D, Blockmans D, Cordier JF, Delaval P, Puechal X, Lauque D, Viallard JF, Zoulim A, Guillevin L. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome. *Ann Intern Med.* 2005;143(9):632-8.
- 74 Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, Bossuyt X, Musset L, Cervera R, Plaza-Lopez A, Dias C, Sousa MJ, Radice A, Eriksson C, Hultgren O, Viander M, Khamashta M, Regenass S, Andrade LE, Wiik A, Tincani A, Ronnelid J, Bloch DB, Fritzler MJ, Chan EK, Garcia-De La Torre I, Konstantinov KN, Lahita R, Wilson M, Vainio O, Fabien N, Sinico RA, Meroni P, Shoenfeld Y. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):17-23.

- 75 ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum.* 1990;33(5):634-43.
- 76 Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Kromminga A, von Landenberg P, Messer G, Witte T, Mierau R. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:166-73.
- 77 Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(8):1420-2.
- 78 Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Marien G, Blockmans D, Bossuyt X. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev.* 2012;12(2):137-43.
- 79 Bruner BF, Guthridge JM, Lu R, Vidal G, Kelly JA, Robertson JM, Kamen DL, Gilkeson GS, Neas BR, Reichlin M, Scofield RH, Harley JB, James JA. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3677-86.
- 80 Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999;111(4):507-13.
- 81 Hiemann R, Buttner 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(1):17-22.
- 82 Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, Tozzoli R, Tampoaia M, Villalta D. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev.* 2014;13(3):292-8.
- 83 Tozzoli R, Antico A, Porcelli B, Bassetti D. Automation in indirect immunofluorescence testing: a new step in the evolution of the autoimmunology laboratory. *Auto Immun Highlights.* 2012;3(2):59-65.
- 84 Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, Weyer MG, Buttner T, Radau B, Krause R, Lehmann B, Feist E, Burmester GR. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R40.

- 85 Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Med.* 2014;12:38.
- 86 Hiemann R, Hilger N, Michel J, Nitschke J, Bohm A, Anderer U, Weigert M, Sack U. Automatic analysis of immunofluorescence patterns of HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1109:358-71.
- 87 Bonroy C, Verfaillie C, Smith V, Persijn L, De Witte E, De Keyser F, Devreese K. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(9):1771-9.
- 88 Voigt J, Krause C, Rohwäder E, Saschenbrecker S, Hahn M, Danckwardt M, Feirer C, Ens K, Fechner K, Barth E, Martinetz T, Stöcker W. Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
- 89 Knutter I, Hiemann R, Brumma T, Buttner T, Grossmann K, Cusini M, Pregolato F, Borghi MO, Anderer U, Conrad K, Reinhold D, Roggenbuck D, Csernok E. Automated interpretation of ANCA patterns - a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):R271.
- 90 Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev.* 2012;11(10):713-6.
- 91 Shovman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T, Shoenfeld Y. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Immunol Res.* 2015;61(1-2):135-40.
- 92 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(12):1131-6.
- 93 Fritzler MJ. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Rev.* 2008;7(8):616-20.
- 94 Pope JE, Johnson SR. New Classification Criteria for Systemic Sclerosis (Scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am.* 2015;41(3):383-98.
- 95 LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1573-6.

96 Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, Baer A, Challacombe S, Lanfranchi H, Schiodt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Whitcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan J, Daniels T. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(4):475-87.

97 Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR, Koziol JA. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1601-11.

98 Satoh M, Chan EK, Sobel ES, Kimpel DL, Yamasaki Y, Narain S, Mansoor R, Reeves WH. Clinical implication of autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2007;3(5):721-38.

99 Satoh M, Mercado MV-D, Chan EKL. Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2009;19(3):219-28.

100 Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Muhlen CA, Andrade LE. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Front Immunol*. 2015;6:412.

101 Craig WY, Ledue TB, Collins MF, Meggison WE, Leavitt LF, Ritchie RF. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(10):1283-6.

102 <http://www.aesku-systems.com/index.php/systems-elisa/helmed-elisa-ifa-processor>.

103 Bucher HC, Schmidt JG, Steurer J. [Critical evaluation of a publication on a diagnostic test]. *Praxis (Bern 1994)*. 1998;87(35):1096-102.

104 Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *Jama*. 1994;271(9):703-7.

- 105 Schwarzer G, Türp J, Antes G. Wahrscheinlichkeitsverhältnis (Likelihood Ratio) – Alternative zu Sensitivität und Spezifität. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*. 2002;57:660-1.
- 106 Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960;20:37-46.
- 107 Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London, UK: Chapman & Hall; 1991.
- 108 Kumar R, Indrayan A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr*. 2011;48(4):277-87.
- 109 Green DM, Swets JA. *Signal detection theory and psychophysics*. John Wiley & Sons, Inc; New York. 1966.
- 110 Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988;240(4857):1285-93.
- 111 Ludemann L, Grieger W, Wurm R, Wust P, Zimmer C. Glioma assessment using quantitative blood volume maps generated by T1-weighted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a receiver operating characteristic study. *Acta Radiol*. 2006;47(3):303-10.
- 112 Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993;39(4):561-77.
- 113 Bortz J. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 6. ed. Heidelberg: Springer; 2005.
- 114 Broadfoot A, Sivertsen T, Baumgart K. Dense fine speckled indirect immunofluorescence pattern in an Australian population. *Pathology*. 2016;48(3):247-50.
- 115 Mengelöglu Z, Tas T, Kocoglu E, Aktas G, Karabörk S. Determination of Anti-nuclear Antibody Pattern Distribution and Clinical Relationship. *Pak J Med Sci*. 2014;30(2):380-3.
- 116 Vermeersch P, Bossuyt X. Prevalence and clinical significance of rare antinuclear antibody patterns. *Autoimmun Rev*. 2013;12(10):998-1003.
- 117 Gerlach S, Affeldt K, Pototzki L, Krause C, Voigt J, Fraune J, Fechner K. Automated Evaluation of Crithidia luciliae Based Indirect Immunofluorescence Tests: A Novel Application of the EUROPattern-Suite Technology. *J Immunol Res*. 2015;2015:742402.

118 Krause C, Ens K, Fechner K, Voigt J, Fraune J, Rohwader E, Hahn M, Danckwardt M, Feirer C, Barth E, Martinetz T, Stocker W. EUROPattern Suite technology for computer-aided immunofluorescence microscopy in autoantibody diagnostics. *Lupus*. 2015;24(4-5):516-29.

119 Copple SS, Jaskowski TD, Giles R, Hill HR. Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy. *J Immunol Res*. 2014;2014:149316.

120 Lakos G, Gonzalez M, Flaherty D, Bentow C, Ibarra C, Stimson D, Nacario L, Hiemann R, Dervieux T. Detection of anti-dsDNA antibodies by computer-aided automated immunofluorescence analysis. *J Immunol Methods*. 2016.

121 Bossuyt X, Cooreman S, De Baere H, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D, Marien G. Detection of antinuclear antibodies by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chim Acta*. 2013;415:101-6.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Clemens Dario Loock, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Automatisierte Bestimmung von Autoantikörpern mit indirekter Immunfluoreszenztechnik: Eine komparative Analyse zweier Automaten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Anteilerklärung an den eingereichten Publikationen

Dario Loock hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Loock D, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Automated ANA evaluation under real-life conditions.

Beitrag im Einzelnen: Loock D. erhob die Daten der Patienten, führte die statistische Auswertung durch und schrieb die Veröffentlichung.

Die Publikation wurde bei Rheumatology International eingereicht und befindet sich im Peer-Review-Verfahren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. G.-R. Burmester: Ich danke insbesondere Prof. Dr. Burmester als Klinikdirektor der Medizinischen Klinik m. S. Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Berlin für die Ermöglichung und Unterstützung des Projektes.

- Dr. Dr. K. Egerer: Ich bedanke mich bei Dr. Dr. Egerer als ursprünglicher Leiter der Autoimmundiagnostik im Labor Berlin für die Hilfe bei der Planung, der Durchführung und der Betreuung des Projektes.

- Mitarbeiter des Autoimmunlabors von Labor Berlin: Mein herzlicher Dank gilt den medizintechnischen Assistentinnen Diana Mielke, Barbara Lehmann, Karin Echterhoff, Rosemarie Krause, Astrid Pohl und Anett Hinkel für die liebenswerte Aufnahme, Einarbeitung und die technische Unterstützung. Weiterhin möchte ich Dr. Christian Meisel, dem jetzigen Leiter der Autoimmundiagnostik im Labor Berlin für seine technische und administrative Unterstützung danken.

- Dr. J.-B. González: Im besonderen Maßen möchte ich Dr. José-Bernardino González für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft, fachliche Kompetenz und motivierende Art danken.

- Familie und Freunde: Große Dankbarkeit empfinde ich meinen Eltern gegenüber für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Vertrauen. Sie haben mich zu dem gemacht, der ich heute bin. Meinem Freund und Kommilitonen, Nicolai Maldaner, möchte ich für unseren gemeinsamen Weg und seine Freundschaft danken, die mich stets bestärkt hat.

- PD Dr. Eugen Feist: Mein größter Dank gilt Dr. Feist, der während des Projektes die Betreuung übernahm. Seine überragende, kluge und stets verfügbare Unterstützung hat maßgeblich zur Vollendung der Promotionsarbeit und Einreichung der Publikation beigetragen. Für die Förderung meiner Entwicklung betrachte ich ihn mit dem höchsten Respekt.