

Labordiagnostik bei Vaskulitiden

Anti- Neutrophile- cytoplasmatische Antikörper. (ANCA)

Es handelt sich um Antikörper, die vorwiegend gegen die in den primären (azurophilen) Granula von neutrophilen Granulozyten lokalisierte Enzyme gerichtet sind. Der Nachweis von ANCA gehört zu den Standarduntersuchungen in der Autoimmundiagnostik. Seit ihrer Entdeckung vor nunmehr 30 Jahren [1, 2] wurden die Methoden des Nachweises kontinuierlich verfeinert und die klinische Aussagekraft für unterschiedlichste Krankheitskollektive wiederholt evaluiert. Dabei bestätigte sich die hohe Sensitivität und Spezifität für die sogenannten ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV).

Zu den AAV werden die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals Wegener'sche Granulomatose), die Mikroskopische Polyangiitis und die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, ehemals Churg-Strauss-Syndrom) sowie die renal limitierte Vaskulitis gezählt. Der durch die heute breite Verfügbarkeit und geringen Kosten bedingte großzügige Einsatz der ANCA-Diagnostik führt aber zunehmend auch zu „falsch“ positiven Ergebnissen und damit zu neuen Interpretationsschwierigkeiten der Testergebnisse. Aktuelle Fragen in diesem Zusammenhang sind, inwieweit „gating“-Strategien die Diagnostik beeinflussen.

Auch bezüglich der technischen Durchführung des Testes besteht Klärungs- und Forschungsbedarf:

Stellenwert der IFT und der Formalin-Fixierung

Die gegenwärtige ANCA Terminologie unterscheidet zwei gut definierte ANCA-Fluoreszenzmuster auf Ethanol fixierten Granulozyten: C-ANCA mit einer diffusen grob granularen zytoplasmatischen Fluoreszenz, die zwischen der Kernlappung der neutrophilen Granulozyten akzentuiert ist und P-ANCA mit einem perinukleären und zum Teil auch nukleären, verstärkten Immunfluoreszenzmuster.

Neben C-ANCA und P-ANCA sind in den letzten Jahren noch sogenannte atypische ANCA oder X-ANCA beschrieben worden. Bei der überwiegenden Mehrheit der atypischen ANCA ist eine periphere nukleare Färbung sowie eine intrazytoplasmatisch homogene Färbung auf Ethanol fixierten Granulozyten zu finden, die in der Mehrheit der Routinelabors nicht sicher erkannt werden und dann fälschlicherweise als „ANA“ befunden wird.

Die noch gültigen Empfehlungen für die ANCA-Testung sehen ein Screening im IFT und bei positivem IFT eine weitere Testung mittels Antigen-spezifischer ELISA vor [3, 4]. Die Kombination von IFT und ELISA zeigt dabei auch nach aktuelleren Untersuchungen und auch unter Einbeziehung der besten verfügbaren Antigen-spezifischen Tests die beste Spezifität und Sensitivität. Sie ist damit unverändert der alleinigen Bestimmung im ELISA, wie sie trotz der anders lautenden Empfehlungen in vielen Laboren zunehmend praktiziert wird, vorzuziehen. Nach einem internationalen Konsensus Dokument ist dabei lediglich die Testung auf Ethanol-fixierten Neutrophilen vorgeschrieben [4]. Eigene Untersuchungen zeigen hier jedoch, dass die zuverlässige Unterscheidung von P-ANCA und Anti-Nukleären-Antikörpern (ANA) nur durch die zusätzliche Testung auf Formalin-fixierten Zellen möglich ist. Auch wegen der klinischen Nähe der infrage kommenden Erkrankungen sollten daher trotz des erhöhten Aufwandes (wenigstens in Referenzlaboren) beide Methoden eingesetzt werden. An einer entsprechenden Verbesserung der Konsensus Empfehlungen wird gearbeitet. Grund für diese Beobachtung ist, dass einige der Antigene durch die Art der Fixierung innerhalb der Zelle „umgelagert“ werden. Insbesondere die eher kationischen Antigene, wie MPO und Humane Leukozyten Elastase (HLE), werden bei der Ethanol-Fixierung in die Nähe des Zellkerns verlagert, woraus dann das perinukleäre Fluoreszenzmuster resultiert (P-ANCA). Bei Formalin-Fixierung geschieht dies nicht, so dass hier alle ANCA-Antigene ein zytoplasmatisches Muster aufweisen (Abbildungen 1 und 2).

Antigen-spezifische ANCA-Tests

Im Laufe der letzten drei Dekaden konnten eine Reihe von ANCA-Zielantigenen identifiziert werden. Eine klinisch relevante Bedeutung, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, wurde aber nur für PR3- und MPO-ANCA gezeigt. Diese beiden Tests sollten daher bei positivem IFT mindestens eingesetzt werden. Das Angebot kommerziell erhältlicher PR3-/MPO-ANCA Immunotests (ELISAs, Chemilumineszenz, Fluoreszenz Enzym-Immunoassay, usw.) ist stetig gewachsen, wobei ein hoher Anteil der erhältlichen Test-Kits keine ausreichende Sensitivität und Spezifität, gemessen am internationalen Standard, aufwies [5, 6]. Hier wäre eine systematische Testung anhand der verfügbaren Standards durch die Herstellerfirmen selbst wünschenswert. Für PR3-ANCA erzielten die sogenannten „anchor“ und „capture“ ELISA die besten Ergebnisse. Für den MPO-ANCA erwies sich ebenfalls ein „capture“ ELISA als vorteilhaft [7, 8]. Beim „capture“ ELISA wird das Antigen nicht direkt sondern über einen weiteren antigenspezifischen Antikörper an die Festphase gebunden. Die noch neueren „anchor“ ELISA benutzen hierzu keinen spezifischen Antikörper, sondern ein „Anker“ - Molekül, dessen genaue Struktur in der Regel nicht veröffentlicht wird. Obwohl solche ELISA der neuesten Generation nach manchen Untersuchungen nicht nur den älteren ELISA sondern auch der IFT überlegen waren [9], wird unverändert durch die Kombination beider Methoden die beste Spezifität und Sensitivität erreicht [10].

Die Bestimmung weiterer Zielantigene, wie z.B. HLE und „Bacterizidal Permeability Increasing Protein“ (BPI), ist in der AAV Routinediagnostik nicht zwingend notwendig, sollte aber in Referenzlaboren vorgehalten werden. Hier gibt es weniger feste Krankheitsassoziationen, jedoch können einige der Antigene auch Hinweise auf Krankheitsursachen geben. So findet sich z.B. bei Kokainkonsumenten gelegentlich ein ANCA gegen HLE. Da bei dieser Personengruppe nicht selten auch Nasenseptumperforationen vorkommen, ergibt sich eine Differentialdiagnose zur GPA, bei der die Bestimmung des HLE-ANCA hilfreich sein kann.

Rationaler Einsatz der ANCA-Testung

Wegen der ausgesprochenen Seltenheit der AAV spielt die Vortestwahrscheinlichkeit bei der ANCA-Diagnostik eine besonders große Rolle. So wäre bei vollkommen nichtselektiver Testung rein rechnerisch die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Menschen bei positivem PR3-ANCA tatsächlich auch eine GPA vorliegt, nur etwa 2 Prozent. Obwohl dieser Zusammenhang an sich jedem Kliniker bekannt sein dürfte (Bayes'sches-Theorem), werden diese Tests sehr häufig im Sinne einer breiten „Schrotschuss-Diagnostik“ angefordert. Somit stellt sich nicht selten die Frage, wie ein positiver Befund bei nicht passender Klinik zu bewerten ist. ANCA sollten demnach nur bei einer mindestens mittleren Vortestwahrscheinlichkeit eingesetzt werden, d.h. dann, wenn ein klinisch begründeter Verdacht auf das Vorliegen einer Vaskulitis besteht. Sinclair und Kollegen untersuchten, wie sich eine „gating“-Strategie auf die ANCA-Diagnostik auswirkte. Dabei wurde der Test nur dann durchgeführt, wenn bestimmte Voraussetzungen in Bezug auf die klinischen Befunde (empfohlenen klinischen Symptomen von ANCA Consensus Statement) erfüllt waren [4]. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich hierdurch die Rate an „falsch“ positiven Befunden reduzieren ließ, ohne an Sensitivität zu verlieren [11, 12]. In niedriger Frequenz lassen sich ANCA auch bei anderen Erkrankungen bzw. klinischen Konstellationen nachweisen, so z.B. bei Kollagenosen, entzündlichen Darmerkrankungen, Malignomen und einer Reihe von Infektionen. Diese „falsch“ positiven Ergebnisse können die Differentialdiagnose z.T. sogar erheblich erschweren. Als Beispiel sei die subakute Endokarditis genannt, die auch unter klinischen Gesichtspunkten z.T. schwer von einer systemischen Vaskulitis zu unterscheiden sein kann und die gelegentlich mit einem ANCA-Nachweis einhergeht. Weiterhin sind durch Medikamente induzierte ANCA zu nennen, die z.T. auch mit der Symptomatik einer Vaskulitis einhergehen können [13].

ANCA-Titer und Krankheitsaktivität

Bei den AAV ließ sich eine enge Beziehung zwischen dem ANCA-Titer bzw. der Quantifizierung im ELISA und der Krankheitsaktivität bisher nicht sicher nachweisen, obwohl zahlreiche Arbeiten hohe Titer zu Beginn der Erkrankung, also in Phasen hoher Aktivität, und einen Abfall bei Erreichen einer Remission beschrieben haben [14, 15]. Dieser Zusammenhang ist aber auch wegen der Schwierigkeit der Quantifizierung der Krankheitsaktivität selbst nur schwer zu beweisen, da die hierzu erhobenen Scores (BVAS) keinen streng quantitativen Messwerten entsprechen und nicht zwangsläufig mit dem "Ausmaß" an Entzündung korrelieren. Mindestens bei einigen Patienten, nach unserer Erfahrung ca. einem Drittel, scheint aber solch ein Zusammenhang zu bestehen. Es besteht Konsens darüber, dass ein Titeranstieg bei fehlenden sonstigen Hinweisen auf Aktivität der Vaskulitis sicher kein Grund sein sollte, die immunsuppressive Therapie zu intensivieren.

Bei den MPO-ANCA ist eine Besonderheit, dass sie sich in Abhängigkeit von der Grunderkrankung unterschiedlich verhalten: während MPO-ANCA bei der EGPA nach Beginn einer Therapie oft rasch negativ werden, persistieren sie bei der MPA häufig auch dann, wenn eine Remission erreicht wurde [16].

Aktuelle Forschungsbemühungen / Ausblick

Obwohl ANCA einen breit etablierten Laborparameter in der Diagnostik der AAV darstellt, gibt es auch nach 30 Jahren ANCA-Forschung weiteres Optimierungspotential. Trotz der genannten Verbesserungen der ELISA-Techniken ist es derzeit noch nicht möglich, auf den IFT zu verzichten. Weitere, ganz andere Testprinzipien haben sich z.T. nicht bewährt (FACS) oder sind, wie die an sich erfolgversprechende automatisierte Mustererkennung im IFT [17], noch unzureichend evaluiert. Darüber hinaus müssen die Strategien, nach denen Labortest angefordert werden, weiter verbessert werden.

Andere krankheitsassoziierte Parameter

Andere krankheitsassoziierte Parameter sind die Kryoglobuline (bei Hepatitis-C-assoziiierter und essenzieller kryoglobulinämischer Vaskulitis), antinukleäre Antikörper (bei Kollagenosen mit sekundärer Vaskulitis), die Erregerserologie (HBs-Antigen, HCV-RNA/Antikörper, HIV-Serologie) und das Differenzialblutbild (Eosinophilie bei Churg-Strauss-Syndrom).

Surrogate-Parameter einer Organbeteiligung

Zur Untersuchung auf eine mögliche Organbeteiligung sollten eine Urinuntersuchung auf dysmorphe Erythrozyten und Albuminurie (jeweils hinweisend auf Glomerulonephritis), eine Überprüfung der Nierenfunktion, die Transaminase (Leberbeteiligung, Hepatitis) und die CK (Vaskulitis im Skelettmuskel, Myositis, Myokardinfarkt bei Coronariitis) bestimmt werden.

Andere Aktivitätsassoziierte Parameter

Bei einer floriden Vaskulitis findet sich fast immer eine Erhöhung von BSG und CRP. Beide Parameter sind jedoch unspezifisch und können auch bei Infektionen erhöht sein. In Zweifelsfällen kann eine Bestimmung des Prokaltitonins hilfreich sein, welches nur bei bakteriellen Infektionen erhöht ist. Komplementspiegel (C3, C4, CH50) sind bei Immunkomplexvaskulitiden erniedrigt.

Literatur

1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;285:606.
2. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;1:425 – 9.
3. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int* 1998;53:743 – 53.
4. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111:507 – 13.
5. Holle JU, Hellmich B, Backes M, Gross WL, Csernok E. Variations in performance characteristics of commercial enzyme immunoassay kits of the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies: what is the optimal cut-off? *Ann Rheum Dis* 2005;64:1773 – 9.
6. Holle JU, Herrmann K, Gross WL, Csernok E. Comparative analysis of different commercial ELISA systems for detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(1 Suppl 70):S66 – 9.
7. Hellmich B, Csernok E, Fredenhagen G, Gross WL. A novel high sensitivity ELISA for detection of antineutrophil cytoplasm antibodies against proteinase-3. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:1 – 5.
8. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, et al. Evaluation of capture ELISA for detection of neutrophilcytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicenter study. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:174 – 80.
9. Pollock W, Trevisin M, Savige J. Testing on formalin-fixed neutrophils is less sensitive and specific for small vessel vasculitis, and less sensitive for MPO-ANCA, than most ELISAs. *J Immunol Methods* 2008;339:141 – 5.
10. Csernok E, Holle JU. Twenty-years with ANCA: how to test for ANCA – evidence based immunology? *Autoimmun Highlights* 2010;1:39 – 45.
11. Sinclair D, Saas M, Stevens JM. The effect of a symptom related “ gating policy ” on ANCA requests in routine clinical practice. *J Clin Pathol* 2004;57:131 – 4.
12. Arnold DF, Timms A, Luqmani R, Misbach SA. Does a gating policy for ANCA overlook patients with ANCA associated vasculitis? An audit of 263 patients. *J Clin Pathol* 2010;63:678 – 80.
13. Csernok E, Lamprecht P, Gross WL. Clinical and immunological features of drug-induced and infection-induced proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and myeloperoxidaseantineutrophil cytoplasmic antibodies and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:43 – 8.
14. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, Lavalley M, Merkel PA. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis—a meta-analysis. *Rheumatology* 2012;51:100 – 9.
15. Csernok E, Gross WL. Diagnostic significance of ANCA in vasculitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:174 – 5.
16. Bremer JP, Csernok E, Gross WL, Moosig F. Getting rid of MPO-ANCA: A matter of disease subtype? *Rheumatology* 2013. Epub ahead of print 25 Jan 2013. DOI: 10.1093/rheumatology/kes412.
17. Knuetter I, Hiemann R, Brumma T, Buttner T, Grossmann K, Cusini M, et al. Automated interpretation of ANCA patterns—a new approach in the serology of ANCA associated vasculitis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R271.