

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D  
(Allg. Innere Medizin sowie Nieren- und Hochdruckkrankheiten und  
Rheumatologie)  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt

**Vergleichende Untersuchungen zur diagnostischen  
Effizienz von Tests zum Nachweis von Autoantikörpern  
gegen Doppelstrang-DNA beim systemischen Lupus  
erythematodes**

**INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des  
doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

vorgelegt von  
Lina Bokern, geb. Kaucikaite  
aus Kaunas, Litauen  
2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Willeke

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Heidemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2012

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**  
**Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D**  
**- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -**  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Willeke  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Heidemann

### **ZUSAMMENFASSUNG**

#### **Vergleichende Untersuchungen zur diagnostischen Effizienz von Tests zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Doppelstrang-DNA beim systemischen Lupus erythematodes**

Bokern, Lina

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung bei der es zu dem Befall zahlreicher innerer Organe kommen kann. Aufgrund eines sehr variablen Verlaufes kann die Diagnose dieser Systemerkrankung schwierig sein. Im Blut von SLE-Patienten lässt sich eine Vielzahl von Autoantikörperphänomenen nachweisen. Der sensitivste Parameter bei der Diagnose eines SLE ist der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT). Eine deutlich höhere Spezifität bei der Diagnostik der Erkrankung haben jedoch Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (Anti-dsDNA-AK).

In dieser Arbeit wurden mittels Seren von 126 SLE-Patienten, 126 gesunden Probanden, 275 Patienten mit anderen rheumatologischen und 41 mit nicht-rheumatologischen Erkrankungen fünf verschiedene Assays (ein Radioimmunoassay (RIA), drei verschiedene ELISA sowie ein automatisierter Fluoreszenz-Immunoassay (FIA)) zur Bestimmung von Anti-dsDNA-AK hinsichtlich ihrer diagnostischen Sensitivität, Spezifität, Effizienz und der prädiktiven Werte untersucht und verglichen. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Assoziationen mit klinischen Parametern untersucht. Zudem wurde auf die Beziehung zwischen den ANA-Mustern im IFT und den Anti-dsDNA-AK eingegangen. Mittels einer ROC-Kurvenanalyse wurde geprüft, ob die Cutoff-Werte der Hersteller geeignet sind, um zwischen SLE-Patienten und einem nicht SLE-Kollektiv zu unterscheiden.

Die größte diagnostische Sensitivität für SLE erreichte der ELISA-Test von ORGenTec®, allerdings bei einer vergleichsweise geringeren Spezifität, was darauf zurückschließen lässt, dass er sowohl nieder- als auch hochaffine Anti-dsDNA-AK erfasst. Alle fünf Assays zeigten einen Anstieg der Antikörper-Titer bei Patienten mit aktivem SLE. Des Weiteren konnte eine Korrelation der Antikörper-Titer mit dem Komplementverbrauch in allen Assays nachgewiesen werden. Zusammenhänge zwischen einer Nierenbeteiligung und der Höhe der Antikörper konnten in keinem Test festgestellt werden.

Der RIA von DPC Biermann® war, trotz seiner Nachteile wie Radioaktivität, größerer Zeitaufwand und höhere Kosten, sowohl den ELISA als auch dem FIA durch die Kombination aus seiner hohen diagnostischen Spezifität und guten diagnostischen Sensitivität überlegen. Daher kann dieser Test in der Diagnostik und auch im Monitoring von SLE empfohlen werden. Beim Vorliegen des ANA-Musters „homogen chromosomen-positiv“ und gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität konnte die Spezifität und durch eine rechnerische Optimierung der Cutoff-Werte die diagnostische Effizienz in einzelnen Tests deutlich gesteigert werden.

Die umfangreiche Untersuchung lieferte einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der verschiedenen Tests, die für eine akkurate Diagnose des SLE und damit der frühen Therapieeinleitung von großer Bedeutung sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2012

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Vergleichende Untersuchungen zur diagnostischen Effizienz von Tests  
zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Doppelstrang-DNA beim  
systemischen Lupus erythematodes

---

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D

---

unter der Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. med. Peter Willeke

---

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Uelzen, 10.01.2012

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Systemischer Lupus erythematoses	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Historie	2
1.1.3. Epidemiologie	2
1.1.4. Ätiopathogenese	3
1.1.5. Klinisches Bild und Differentialdiagnosen	4
1.1.6. Diagnostik	5
1.1.7. Therapie	7
1.2. Antikörper	7
1.2.1. Antinukleäre Antikörper	7
1.2.2. Antikörper gegen dsDNA	9
1.3. Problemstellung	11
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1. Auswahl der Patienten	13
2.1.1. SLE-Patienten	14
2.1.2. Patienten mit Nicht-SLE-Kollagenosen	17
2.1.3. Patienten mit systemischen Arthritiden	17
2.1.4. Patienten mit primären Vaskulitiden	18
2.1.5. Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen	18
2.1.6. Patienten mit Infektionen	18
2.1.7. Übergreifende Kollektive	19
2.1.8. Gesunde	19
2.2. Messung der Anti-dsDNA-AK	19

2.2.1. Farr-RIA	20
2.2.1.1. Prinzip des Farr-RIA	20
2.2.1.2. Farr-RIA von DPC Biermann® (DPC)	20
2.2.2. ELISA	21
2.2.2.1. Prinzip des ELISA	21
2.2.2.2. ELISA von ORGenTec® (ORG)	21
2.2.2.3. ELISA von The Binding Site® (TBS)	22
2.2.2.4. ELISA von Euroimmun® (EUR)	23
2.2.3. FIA	24
2.2.3.1. Prinzip des FIA	24
2.2.3.2. FIA von Pharmacia® (PHA)	24
2.3. Bestimmung von ANA mittels indirekter Immunfluoreszenz	25
2.3.1. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (IFT)	25
2.3.2. IFT	25
2.4. Nephelometrische Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4	27
2.4.1. Prinzip der Nephelometrie	27
2.4.2. Nephelometer BN II von Dade Behring®	28
2.5. Statistische Methoden	28
2.5.1. Diagnostische Sensitivität, Spezifität, Effizienz und prädiktive Werte	28
2.5.2. Receiver Operating Characteristic Kurvenanalyse(ROC)	29
2.5.3. Statistische Tests	30
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1. Allgemeine diagnostische Sensitivität	31
3.2. Allgemeine diagnostische Spezifität	32

3.3. Diagnostische Effizienz	33
3.4. Prädiktive Werte	34
3.5. Relative Erhöhung der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in drei Studienkollektiven	35
3.6. Konkordanz	37
3.7. Korrelation der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen	37
3.8. Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität	40
3.8.1. Prävalenz von Anti-dsDNA-AK	40
3.8.2. Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen	41
3.8.3. Anti-dsDNA-AK und Komplementfaktoren C3c, C4	43
3.8.3.1. Korrelation zwischen den Anti-dsDNA-AK und den Komplementfaktoren C3c und C4	45
3.9. Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der SLE-Therapie	48
3.10. Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der Nierenbeteiligung im SLE-Kollektiv	50
3.10.1. Prävalenz und Konzentrationen von Anti-dsDNA-AK	50
3.11. Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von den ANA-Mustern	51
3.11.1. IFT	51
3.11.2. Prävalenz von Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit vom ANA-Muster	53
3.11.3. Kombination von Anti-dsDNA-AK-Assays und IF	55
3.11.3.1. Diagnostische Sensitivität und Spezifität	55
3.11.3.2. Diagnostische Effizienz	57
3.11.3.3. Prädiktive Werte	57
3.12. ROC-Kurvenanalyse	59
3.12.1. Optimierung der Cut-off-Werte	60
3.12.1.1. ROC-Analyse für DPC	61
3.12.1.2. ROC-Analyse für ORG	62



3.12.1.3.	ROC-Analyse für TBS	63
3.12.1.4.	ROC-Analyse für EUR	64
3.12.1.5.	ROC-Analyse für PHA	65
3.12.2.	Zusammenfassung der ROC-Analyse	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Schlusswort</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>101</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Systemischer Lupus erythematoses

### 1.1.1 Definition

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine immungenetisch geprägte, chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung, die durch einen multiplen Organbefall und sehr variable Verlaufsformen gekennzeichnet ist (Smolen JS et al. 1998, Gualtierotti R et al. 2010). Der SLE zählt zu der Gruppe der „Kollagenosen“. Diese stehen für chronisch-rheumatische Erkrankungen mit dem gemeinsamen pathomorphologischen Korrelat der fibrinoiden Nekrose (Klemperer P et al. 1941). Zu den „Kollagenosen“ im engeren Sinne zählt man folgende systemische Autoimmunerkrankungen:

- Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
- Progressiv systemische Sklerose (PSS)
- Dermato-/Polymyositis
- Mischkollagenose (MCTD)
- Sjögren-Syndrom

Zahlreiche Autoimmunphänomene, klinische und serologische Überlappungen und eine ungewöhnliche Variabilität des Krankheitsverlaufes sind diesen Erkrankungen gemeinsam. Die Prognose hängt im Wesentlichen vom Organbefall, der unterschiedlich schwer sein kann, ab. Aufgrund eines häufig heterogenen Krankheitsbildes sowie der großen Ähnlichkeit unter den einzelnen Erkrankungen ist es weiterhin schwierig, trotz spezifischer Diagnosekriterien, eine genaue Diagnose schnell und effizient zu stellen. Jedoch ist eine frühzeitige Diagnosestellung für den weiteren Verlauf der Erkrankung wichtig, da spezifische Therapien hiernach eingeleitet werden können.

Der Begriff antinukleärer Antikörper (ANA) steht für die Gesamtheit aller Antikörper (AK) gegen Antigene (Ag) im Zellkern. Diese lassen sich mit

unterschiedlicher Prävalenz bei Kollagenosen nachweisen (s.u.) und spielen daher bei der Diagnostik eine wesentliche Rolle. ANA können gegen unterschiedliche Strukturen innerhalb des Zellkerns, aber auch innerhalb des Zytoplasmas gerichtet sein. Beim SLE lassen sich in den meisten Fällen Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) nachweisen.

### **1.1.2 Historie**

Im 18. Jahrhundert wurde der Term „Lupus“ (Latein: Wolf) zur Beschreibung verschiedener Hautläsionen benutzt. 1833 erwähnte BIETT den Lupus erythematoses. Mehrere Jahre wurde diese Krankheit als eine reine Hautschädigung betrachtet. 1872 beschrieb KAPOSI die systemische Natur des Lupus erythematoses. Durch die Entdeckung der LE-Zellen 1948 durch HARGRAVES und seine Arbeitsgruppe (Hargraves MM et al. 1948) konnte die Diagnose ebenfalls immunologisch gesichert werden. 1957 wurden AK gegen DNA im Serum von SLE-Patienten erstmals beschrieben. (Holborow J et al. 1957, Ceppellini R et al. 1957, Robbins WC et al. 1957).

### **1.1.3 Epidemiologie**

SLE ist eine relativ seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 5-7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz, die je nach Alter, Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit variiert, liegt bei 10-50 pro 100.000 Einwohner. In der schwarzen Bevölkerung sind Inzidenz, Prävalenz und Mortalität dreimal höher als in der weißen Bevölkerung (Hochberg MC 1990, Klippel JH 1997, Mills JA 1994, Robertson CA et al. 2000).

Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer (Frauen:Männer = 10:1) (Fernando MMA et al. 2005). Besonders häufig erkranken Frauen im gebärfähigen Alter (20. bis 40. Lebensjahr), weshalb Östrogene als ein wichtiger Krankheitsauslöser diskutiert werden (Mills JA 1994, Klippel JH 1997, American College of Rheumatology 1999).

Das Prädilektionsalter für SLE liegt um das 30. Lebensjahr. Kinder und Menschen über 65 Jahre erkranken seltener. Die Prävalenz in diesen

Altersgruppen liegt bei nur 1-2 pro 100.000 Einwohner und Frauen sind 2 bis 5 Mal häufiger betroffen (Mills JA 1994).

Die 10-Jahresüberlebensrate liegt bei 80-90%. Nach 20 Jahren leben noch 65% der Betroffenen. Das Überleben hängt stark von der Anzahl der Exazerbationen im Laufe der Erkrankung sowie der Therapie ab (Shinjo SK et al. 2010, Swaak AJ et al. 1989, Pistiner M et al. 1991, American College of Rheumatology 1999, Cervera R et al. 2002).

#### **1.1.4 Ätiopathogenese**

Die Entstehung der Erkrankung ist noch immer nicht vollständig geklärt. Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung aus. Genetische, hormonelle, immunologische (Auto-AK-Bildung) und auch exogene Faktoren wie zum Beispiel Virusinfektionen, Chemikalien oder Medikamente spielen in der Pathogenese möglicherweise eine wichtige Rolle (, Ando DG et al. 1987, Smolen et al. 1998, Herrmann M. et al. 2000, Sawalha AH et al. 2004, Gualtierotti R et al. 2010).

Die Vermutungen für die genetische Beteiligung beim SLE stammen aus der Beobachtung unterschiedlicher Konkordanzraten bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen und ebenfalls aus der beobachteten familiären SLE-Häufung. Es wird angenommen, dass kein einzelnes Gen, sondern mehrere Gene und unterschiedliche Umweltfaktoren gemeinsam SLE auslösen können (Reichlin M et al. 1992, Tan FK et al. 1998, Robertson CA et al. 2000, Sawalha AH et al. 2004, Delgado-Vega A et al. 2010). Zur Diskussion steht, dass SLE ebenfalls durch Umweltfaktoren wie UV-Strahlen ausgelöst werden kann. Für diesen Zusammenhang spricht, dass Schübe und ein Neuauftreten der Erkrankung häufiger in den Sommermonaten beobachtet werden (Hasan T et al. 2004).

Zudem wird vermutet, dass verschiedene Auto-AK bei der SLE-Entstehung beteiligt sind (Witte T 2008). Auto-AK können sowohl durch die Fc-Rezeptor-vermittelte Entzündung als auch durch die direkte Zellschädigung, die gewöhnlich komplementabhängig ist, zur Zell- und Gewebszerstörung führen (Weening JJ et al. 2004). AK, die sich gegen Proteine, Polysaccharide oder Nukleinsäuren richten, bilden mit den Ag und angelagerten

Komplementfaktoren einen Verbund, der als Immunkomplex bezeichnet wird. Hierbei wird das Komplementsystem aktiviert, und insbesondere die Komplementfaktoren C4 und C3c verbraucht, wobei einzelne Komplementspaltprodukte (C3e, C3d) vermehrt gebildet werden. Sowohl die Auto-AK als auch die Immunkomplexe können an negativ geladene Oberflächen, wie zum Beispiel an die glomeruläre und epidermale Basalmembranen, den Plexus choroideus, kleine Arterien oder andere Gewebe binden, was die Vielfalt der Krankheitsmanifestation erklären kann (Witte T 2008, Schmiedeke T et al. 1992, Stockl F et al. 1994, Vogt A et al. 1993). Bei dem Autoimmunprozess kommt es im Verlauf zur Aktivierung polyklonaler B-Zellen, die wiederum vermehrt Auto-AK produzieren. Daraus ergibt sich ein Krankheitsprozess, der sich selbst perpetuiert und in seiner Aktivität ansteigen kann (Herrmann M. et al. 2000).

### **1.1.5 Klinisches Bild und Differentialdiagnosen**

Im Frühstadium kommt es beim SLE zunächst häufig zu unspezifischen Allgemeinsymptomen wie vermehrter Müdigkeit, Leistungsschwäche, Gewichtsverlust, Fieber, Sonnenempfindlichkeit mit Exanthenen und Arthralgien. Initial sind ebenfalls häufig unterschiedliche Haut- und Schleimhautläsionen wie das typische Schmetterlingserythem, das sich über den Nasenrücken auf beide Wangen ausdehnt, Hyperkeratosen, aphtöse Läsionen zu beobachten. Grundsätzlich kann sich die Erkrankung auf die Allgemeinsymptome sowie die Hautveränderungen beschränken, was somit eine günstige Prognose hätte. Jedoch können im Verlauf auch mehrere Organsysteme (Gelenke, Muskulatur, Magen-Darm-Trakt, Lungen, Herz, ZNS, Nieren, das hämatopoetische System und andere) betroffen sein. Insgesamt hat eine Nierenbeteiligung beim SLE den gravierendsten Einfluss auf die Prognose (Ginzler EM et al. 1982, Rothfield NF 1977, Vogt A et al. 1993, Seleznick MJ et al. 1991, Sauter M et al. 2007). Je früher die Krankheit ausbricht, desto größer ist das Risiko, eine klinisch relevante Nephritis zu entwickeln. 80-90% der Patienten, die im Kindesalter erkrankt sind, leiden

später an einer Nephritis (Klippel JH 1997, Cervera R et al. 2002). Nicht selten endet eine Lupusnephritis in chronischer Niereninsuffizienz.

Einen Überblick über die Krankheitssymptome und deren Häufigkeit gibt die Tabelle 1.1:

<b>Tab. 1.1: Häufigkeit der Krankheitssymptome beim SLE (eigene Darstellung)</b>	
<b>Symptome</b>	<b>Häufigkeit in %</b>
Müdigkeit	80 - 100
Fieber	80
Schmetterlingserythem	50 - 70
Photosensibilität	15 - 40
Sekundäres Raynaud-Syndrom	40 - 60
Arthralgien / nichterosive Arthritis	95
Myalgien / Myositis	5 - 10
Pleuritis	50 - 60
Perikarditis	20 - 25
Krampfanfälle	10
Periphere Neuropathie	5 - 20
Nephritis	50
Leukozytopenie	40 - 50
Anämie	50 - 80
Thrombozytopenie	20 - 30

Vergleichbare Symptome können allerdings auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen vorkommen. Mögliche Differentialdiagnosen für SLE sind z.B. andere Kollagenosen, eine idiopathische thrombozytopenische Purpura oder Vaskulitiden.

### **1.1.6 Diagnostik**

Durch die überaus große klinische Variabilität ist die Erkrankung häufig schwer zu diagnostizieren. Daher beträgt die durchschnittliche diagnostische Latenz bei SLE laut Angaben der Deutschen Rheumaliga etwa 2 Jahre. Das American College of Rheumatology (ACR) hat einen Katalog von diagnostischen Kriterien für das Vorliegen eines SLE definiert. Die 1997 modifizierten ACR-Klassifikationskriterien (siehe Tabelle 1.2) fassen zahlreiche klinische und laborchemische Parameter zusammen (Tan EM et al. 1982). Falls vier oder

mehr dieser elf Kriterien erfüllt sind, kann die Diagnose SLE mit einer 96%-igen Spezifität und einer 96%-igen Sensitivität gestellt werden.

<b>Tab. 1.2: ACR-Klassifikationskriterien (1982, modifiziert 1997)</b>	
<b>1. Schmetterlingserythem</b>	flaches oder erhabenes Exanthem beider Wangen, die Nasolabialfalten aussparend
<b>2. Diskoide Hautläsionen</b>	erythematöse erhabene Flecken mit keratotischer Schuppung und atrophischen Narben
<b>3. Photosensibilität</b>	Hautrötung infolge einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenlicht
<b>4. Ulzerationen</b>	orale oder nasopharyngeale Ulzera, gewöhnlich ohne Schmerzen
<b>5. Arthritis</b>	nichterosive Arthritis an zwei oder mehr peripheren Gelenken mit Schwellung oder Erguss und Schmerzen
<b>6. Serositis</b>	a) Pleuritis (Reibegeräusche oder Erguss in der Anamnese oder aktuell) <b>Oder</b> b) Perikarditis (EKG, Auskultation oder Echokardiogramm)
<b>7. Nierenbeteiligung</b>	a) persistierende Proteinurie über 0,5 g in 24 Std. <b>Oder</b> b) Zylindrurie (Erythrozyten, Hämoglobin, granulierte oder gemischte)
<b>8. ZNS-Beteiligung</b>	a) Krämpfe (ohne mögliche andere Ursachen wie Medikamente, Elektrolytstörungen, Ketoazidose oder Urämie) <b>Oder</b> b) Psychose (nach Ausschluss möglicher anderer Ursachen)
<b>9. Blutbildveränderungen</b>	a) hämolytische Anämie mit Retikulozytose <b>Oder</b> b) Leukozytopenie: <4000/mm <sup>3</sup> <b>Oder</b> c) Lymphozytopenie: <1500/mm <sup>3</sup> <b>Oder</b> d) Thrombozytopenie: <100000/mm <sup>3</sup>
<b>10. Immunologische Veränderungen</b>	a) positive LE-Zellphänomene (2 Zellen pro Gesichtsfeld) <b>Oder</b> b) AK gegen dsDNA mit pathologischen Titern <b>Oder</b> c) AK gegen Sm (Smith-Kernantigen) <b>Oder</b> d) Anti-Phospholipid-AK <b>Oder</b> e) falsch positive Syphilis-Tests über 6 Mo. (Testverfahren: TPHA oder FTA)
<b>11. Antinukleäre Antikörper</b>	pathologische Titer von AK gegen Kernantigen (indirekte Immunofluoreszenz u. a.) ohne gleichzeitige Gabe von Medikamenten, die einen medikamenteninduzierten LE auslösen können
Mindestens <b>4 dieser 11 Kriterien</b> müssen gleichzeitig oder im Verlauf eines beliebigen Zeitraums vorhanden sein, um die Diagnose SLE stellen zu können	

### **1.1.7 Therapie**

Die Behandlung des SLE richtet sich nach dem Schweregrad und Organbefall. Neben einem chronischen Verlauf kann es beim SLE durch unterschiedliche Ursachen zu einem Krankheitsschub mit vermehrter Erkrankungsaktivität kommen. Im akuten Schub wird der SLE meist mit höherdosierten Kortikosteroiden und Cyclophosphamid behandelt. Als Langzeittherapie werden unterschiedliche immunmodulierende Medikamente (sogenannte Basismedikamente) verabreicht. Hierzu gehören Hydroxychloroquin, Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin-A oder Mycophenolat-Mofetil. Die Substanzen werden teilweise in speziellen Kombinationsschemata gegeben. Eine supportive Therapie, bestehend z.B. aus einer Schmerztherapie, Physiotherapie und z.T. Psychotherapie, ist bei der Behandlung des SLE ebenfalls häufig indiziert.

## **1.2 Antikörper**

### **1.2.1 Antinukleäre Antikörper**

ANA sind eine Gruppe heterogener Antikörper, die gegen verschiedene Zellkernantigene, wie Nukleosomen, dsDNA, Einzelstrang-DNA (ssDNA), Histone (H1 – H4) und Non-Histon-Proteine (Sm, snRNP, SS-A/Ro, SS-B/La) gerichtet sind (s.o.). Es wird diskutiert, dass die Apoptose der zirkulierenden Lymphozyten bei SLE-Patienten bis zu 2,4 Mal häufiger als in der gesunden Bevölkerung oder bei Patienten mit rheumatoider Arthritis vorkommt. Durch die gesteigerte Apoptose sind die Makrophagen nicht mehr in der Lage, die apoptotischen Zellen und die Zellkernreste, die als Ag dienen, adäquat zu beseitigen. Diese Ag stimulieren das Immunsystem, was wiederum zur Bildung der ANA führt (Emlen W et al. 1994, Kalden JR. 1996, Herrmann M. et al. 2000, Stuart L et al. 2002, Weening JJ et al. 2004).

ANA werden seit ihrer Entdeckung in der Diagnostik der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Am häufigsten werden hochaffine ANA der IgG-Klasse beim SLE- und beim Sjögren-Syndrom nachgewiesen. Sie



besitzen eine hohe diagnostische Sensitivität bei SLE-Patienten (>95%) und Sjögren-Patienten (>90%), die mit einem entsprechend hohen negativ prädiktiven Wert verbunden ist (Hochberg MC 1990, Ulvestad E et al. 2000, Sawalha AH et al. 2004). Allerdings ist ihre diagnostische Spezifität deutlich eingeschränkt, da u.a. auch in den Seren der gesunden, vor allem älteren, Bevölkerung und bei anderen rheumatischen und nichtrheumatischen Erkrankungen meist niedrige ANA-Titer nachgewiesen werden. Die Aussagekraft der ANA-Titer bezüglich der Krankheitsaktivität und des Therapieerfolgs ist ebenfalls sehr eingeschränkt.

Zum Screening auf ANA hat sich indirekte Immunfluoreszenz (IFT) mit sog. HEp 2-Zelle ("Humane Epitheliumzelllinie") durchgesetzt. Es handelt sich hierbei um eine humane Larynxkarzinomzelllinie. Krebszellen zeichnen sich durch eine vermehrte Teilungsaktivität aus, wodurch sämtliche Stadien der mitotischen Zellteilung nachweisbar sind, was die Bestimmung der unterschiedlichen AK-Muster ermöglicht.

Die in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachweisbaren Muster geben erste Hinweise auf die Spezifität der ANA (z.B. gesprenkelt: U1-RNP, Sm; nukleolär: RNA-Polymerase, Ku, PM-Scl; Kernmembran - Lamina, gp210). Die Anfärbung der Chromosomen in der Metaphase ist ein wichtiges Anzeichen für das Vorliegen diagnostisch relevanter AK (z.B. anti-dsDNA, Scl-70).

ANA-positive Seren mit einem charakteristischen Fluoreszenzmuster für SLE (z.B. homogene Anfärbung des Zellkernes und der kondensierten Chromosomen, kurz „homogen Chromosomen positiv“ bezeichnet) werden dann in einem zweiten spezifischen Testverfahren auf AK gegen dsDNA (Anti-dsDNA-AK) untersucht (s.u.).

In der Tabelle 1.3 sind Erkrankungen, bei denen ANA nachgewiesen werden, und deren Häufigkeit aufgelistet.

<b>Tab. 1.3: Häufigkeit der ANA's</b> (eigene Darstellung nach Kavanaugh A et al. 1999)	
<b>Erkrankung</b>	<b>Häufigkeit in %</b>
SLE	95 - 100
Drug-SLE	100
Diskoider LE	5 - 25
Mischkollagenose	100
Sjögren-Syndrom	40 - 70
Autoimmun-chron. aktive Hepatitis	100
Progressive Systemsklerose	60 - 80
Dermato-/Polymyositis	30 - 80
Rheumatoide Arthritis	30 - 50

### 1.2.2 Antikörper gegen dsDNA

Der diagnostisch wichtigste Laborparameter beim SLE ist der Nachweis von Anti-dsDNA-AK, welche sich bei ca. 60-85% der SLE-Patienten nachweisen lassen (Mutasim DF et al. 2000). Mögliche molekulare Erkennungsstrukturen dieser Antikörperspezies sind das Desoxyribose-Phosphat-Gerüst, die Basenpaare der Doppelhelix oder die Doppelhelixkonformation selbst. Mit Blick auf die pathogenetische Bedeutung dieser Auto-AK ist interessant, dass Anti-dsDNA-AK bereits mehr als zwei Jahre vor dem eigentlichen Krankheitsausbruch bei SLE-Patienten nachweisbar sein können. Bei 55% der SLE-Patienten werden Anti-dsDNA-AK schon vor der Diagnosestellung nachgewiesen (Greer JM et al. 1989, Smeenk RJT et al. 1992, Arbuckle MR et al. 2001, Arbuckle MR et al. 2003). Die Anti-dsDNA-AK haben zudem möglicherweise auch eine prognostische Relevanz. So kommt es häufig vor einer klinischen Aktivitätszunahmen zum Anstieg der Anti-dsDNA-AK-Konzentration. (Ter Borg EJ et al. 1990, Witte T, Hartung K, Matthias T et al. 1998, Hahn BH 1998, Arbuckle MR et al. 2001, Sawalha AH et al. 2004). Zu erwähnen sind auch AK gegen ssDNA, die jedoch in der Pathogenese des SLE eine untergeordnete Rolle spielen.

Es lassen sich grundsätzlich drei Isotypen (IgA, IgM und IgG) der Anti-dsDNA-AK nachweisen. Von der höchsten diagnostischer Relevanz für den SLE sind Anti-dsDNA-AK vom IgG Isotyp, da diese eine hohe Spezifität für SLE besitzen bzw. bei anderen rheumatologischen Erkrankungen nur selten auftreten (Hahn

BH 1998). Einen Überblick über die Isotypen der Anti-dsDNA-AK und deren Eigenschaften gibt die Tabelle 1.4.

<b>Tab. 1.4:</b> Isotypen der Anti-dsDNA-AK (eigene Darstellung)	
IgG-Typ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• im Serum der SLE-Patienten am häufigsten zu finden</li> <li>• stark assoziiert mit der Lupusnephritis (Witte T et al. 1998)</li> </ul>
IgA-Typ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eher bei jüngeren Patienten nachzuweisen</li> <li>• assoziiert mit Vaskulitis, akralen Nekrosen, Erythemen, erhöhter BSG, Komplementverbrauch (Witte T, Hartung K, Matthias T et al. 1998)</li> </ul>
IgM-Typ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schutz vor der Nierenbeteiligung</li> <li>• treten unabhängig vom Alter und Geschlecht auf</li> <li>• sinken mit zunehmenden Krankheitsjahren (Witte T et al. 1998)</li> <li>• können zirkulierende dsDNA binden und somit verhindern, dass sich pathologische IgG-Immunkomplexe, die Lupusnephritis induzieren, bilden (Witte T et al. 1998)</li> </ul>

Darüber hinaus sind hochaffine Anti-dsDNA-AK vom IgG-Typ mit einer Nierenbeteiligung assoziiert (Kalden JR 1996).

Anti-dsDNA-AK lassen sich mittels verschiedener Testsysteme nachweisen. Hierzu gehören die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) mit *Crithidia luciliae*, Fluoreszenz-Immunoassay (FIA), ein Radioimmunoassay (RIA), sowie ein Enzym-linked immuno sorbent assay (ELISA). Hierdurch werden die AK in unterschiedlichem Ausmaß erfasst (Salonen EM et al. 2004). Eine deutlich geringere diagnostische Spezifität bei gleichzeitig hoher Sensitivität weisen demgegenüber Anti-dsDNA-AK mit niedriger Affinität auf. Diese AK finden sich bereits in der Frühphase eines SLE, können aber auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen nachweisbar sein. Hierzu zählen andere Kollagenosen, die rheumatoide Arthritis (RA), andere Autoimmunerkrankungen (z.B. Autoimmunthyreopathien oder autoimmune Hepatopathien), aber auch infektiöse Erkrankungen (z.B. chronische Hepatitis, HIV-Infektion) (Swaak T et al. 1987).

In der Routinediagnostik wird häufig zunächst eine Stufendiagnostik für den Nachweis von ANA durchgeführt. Sind diese positiv und weisen ein typisches Fluoreszenzmuster auf, wird dann in einem zweiten, spezifischen Testverfahren das Vorliegen von Anti-dsDNA-AK untersucht. ANA-negative Seren enthalten demgegenüber nur in sehr seltenen Fällen Anti-dsDNA-AK, so dass im

Regelfall bei ANA-Negativität auf die gezielte Bestimmung dieser AK in einem zweiten Testverfahren verzichtet werden kann.

Anti-dsDNA-AK im Serum von Nicht-SLE-Patienten weisen darauf hin, dass ein 85%-iges Risiko besteht, SLE oder dessen Unterformen im Verlauf zu entwickeln (Swaak T et al. 1987).

Ein positiver Anti-dsDNA-AK-Nachweis kann die Diagnose SLE bestätigen, wobei ein negatives Testergebnis diese nicht sicher ausschließen kann, da Anti-dsDNA-AK nur bei 60-85% der SLE-Patienten zu finden sind (Mutasim DF et al. 2000).

### **1.3 Problemstellung**

Da der Nachweis von Anti-dsDNA-AK ein wichtiges diagnostisches Kriterium für den SLE ist, müssen die Testsysteme für diese AK eine hohe Spezifität und Sensitivität besitzen. Die Tests sollten einfach und schnell durchführbar sein und möglichst auf potentiell gesundheitsschädliche Reagenzien verzichten (z.B. Radioaktivität). Die auf dem Markt vorhandenen Testsysteme für Anti-dsDNA-AK unterscheiden sich hinsichtlich des Testprinzips (IFT, ELISA, FIA, RIA), des Grades der Mechanisierung (manueller oder automatisierter Test), der Art des verwendeten Ag (rekombinant oder nativ gereinigt), der Festphasenbeschichtung, der Kalibration (meist bezogen auf den WHO Wo/80 Referenzkalibrator), der Nachweisgrenze, des Mess- und Referenzbereiches sowie der Erfassung von AK unterschiedlicher Affinität (niedrig und hoch) und unterschiedlichen Isotyps (meist IgG, RIA auch IgA und IgM).

In dieser Arbeit sollten fünf kommerzielle Assays zur Bestimmung von Anti-dsDNA-AK (ein Farr-RIA, drei ELISA und ein FIA) hinsichtlich ihrer diagnostischen Leistungsfähigkeit (Sensitivität, Spezifität, Effizienz, positive und negative Prädiktion) bei SLE untersucht werden. Zur Optimierung des diagnostischen Vorgehens wurden darüber hinaus die Hersteller Cutoff-Werte und die Strategie einer kombinierten Testbewertung aus ANA-Immunfluoreszenz und Anti-dsDNA-AK-Assay geprüft.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Höhe der Anti-dsDNA-AK Hinweise auf die Organbeteiligung im Rahmen der Erkrankung gibt oder ob diese mit der Aktivität der Erkrankung korreliert.

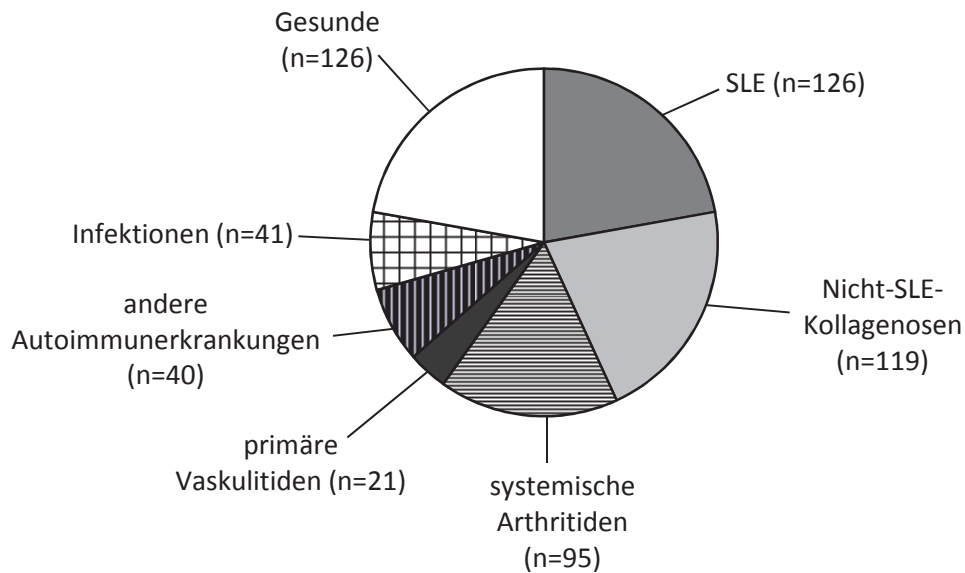
## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Auswahl der Patienten**

In dieser Studie wurden Seren von insgesamt 442 verschiedenen Patienten der Medizinischen Kliniken und Polikliniken B und D sowie der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Münster bzw. 126 gesunden Probanden untersucht. Die Sammlung der Seren erfolgte im Zeitraum von September 1997 bis April 2004. Die Seren der gesunden Kontrollgruppe wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt. Alle Seren wurden bis zur Untersuchung bei -70°C gelagert.

Im Rahmen der klinischen Datenerhebung erfolgte die Erfassung der jeweiligen diagnostischen Kriterien (klinische Zeichen und Symptome, morphologische Untersuchungsbefunde, labordiagnostische Befunde). Beim SLE im speziellen wurde das Vorliegen der ACR-Kriterien von 1982 überprüft. Zur Beurteilung eines möglichen therapeutischen Einflusses auf die Nachweisbarkeit von Anti-dsDNA-AK wurden bei den Patienten die Medikamente (insbesondere immunmodulierende Pharmaka) zum Zeitpunkt der Probenahme dokumentiert. Patienten, die die festgelegten Kriterien nicht vollständig erfüllten, deren klinische Diagnose nach Rücksprache mit den behandelnden Ärzten jedoch eindeutig war, wurden ebenfalls in die Studie aufgenommen.

**Abb. 2.1:** Aufteilung des untersuchten Patientenkollektives und der gesunden Probanden



### 2.1.1 SLE-Patienten

Es wurden Seren von 126 SLE-Patienten untersucht, welche alle die ACR-Kriterien für den SLE erfüllten. Bei 112 Patienten waren die ACR-Kriterien auch ohne das Kriterium der Anti-dsDNA-AK-Positivität erfüllt.

Das Durchschnittsalter der SLE-Patienten lag bei 41,8 (17–76) Jahren. Die Altersgruppe zwischen dem 30. und 39. Lebensjahr war mit 39 Patienten am stärksten vertreten. Das Geschlechtsverhältnis betrug 115 Frauen zu 11 Männern. Das Alter bei Erstdiagnose streute vom 9. bis zum 66. Lebensjahr. Der Mittelwert lag bei 30,8 Lebensjahren.

Die Krankheitsdauer variierte stark und lag im Bereich zwischen einem Monat und 33 Jahren. Die mittlere Krankheitsdauer betrug 11,2 Jahre.

Die Organbeteiligungen waren bei den SLE-Patienten sehr vielfältig. Ausgehend von den ACR-Kriterien konnten folgende Organbeteiligungen im SLE-Kollektiv (siehe Tabelle 2.1) nachgewiesen werden.

<b>Tab. 2.1: Organbeteiligung im SLE-Kollektiv (n= 126)</b> (eigene Darstellung)		
<b>Organsystem</b>	<b>Patienten-Anzahl</b>	<b>% der SLE-Gruppe</b>
Haut	106	84,1
Gelenke	119	94,4
Niere	33	26,2
Herz	4	3,2
ZNS	17	13,5

Die Aktivität der Erkrankung wurde mit Hilfe des SLEDAI-2K (SLE Disease Activity Index 2000) ermittelt. Der ursprüngliche SLEDAI wurde 1985 zur Erfassung der klinischen Aktivität bei SLE entwickelt. Es wurden nur Ereignisse gezählt, die sich in den letzten 10 Tagen und am Tag der Untersuchung ereignet hatten (Committee on Prognosis Studies 1986, Bombardier C et al. 1992). 2000 wurde der SLEDAI-Score modifiziert und SLEDAI-2K genannt (Gladman DD et al. 2002). Hierbei wurden vier Variablen (Proteinurie, Lupus-Ausschlag, Alopecie und Schleimhautulzera) auch dann gewertet, wenn sie bereits länger bestanden. SLEDAI-2K und SLEDAI sind in der Vorhersage der Mortalität, in der Beschreibung der Krankheitsaktivität und in der Beschreibung der Veränderung der Krankheitsaktivität in der Zeit zwischen zwei Arztbesuchen vergleichbar. In der folgenden Tabelle sind die im SLEDAI-2K-Score untersuchten Organsysteme, deren Symptome und die entsprechende Punktzahl aufgelistet.



<b>Tab. 2.2: SLEDAI-2K-Score</b> (eigene Darstellung nach Gladman DD et al. 2002)		
<b>Organsysteme</b>	<b>Befunde</b>	<b>Punkte</b>
<b>ZNS</b>	Krampfanfälle	8
	Psychosen	8
	organisches Hirnsyndrom	8
	Störungen der Augen	8
	Störungen der Hirnnerven	8
	Lupus-Kopfschmerzen	8
	cerebrovaskuläre Ereignisse	8
<b>Gefäße</b>	Vaskulitis	8
<b>Gelenke und Muskulatur</b>	Arthritis	4
	Myositis	4
<b>Nieren</b>	Urin-Zylinder	4
	Hämaturie	4
	Proteinurie	4
	Pyurie	4
<b>Haut</b>	Lupus-Ausschlag	2
	Alopecie	2
	Schleimhautulcera	2
<b>Serosahäute</b>	Pleuritis	2
	Perikarditis	2
<b>Immunsystem</b>	erniedrigte Komplementfaktoren	2
	erhöhte DNA-AK im RIA	2
<b>Allgemeinbefinden</b>	Fieber	1
<b>Blut</b>	Thrombozytopenie	1
	Leukozytopenie	1
<b>Gesamtpunktzahl</b>		<b>105</b>

Die höchste Punktzahl von 28 Punkten erreichte im untersuchten SLE-Kollektiv eine Patientin. Am häufigsten, nämlich von 32 Patienten, wurden vier Punkte erreicht. Die durchschnittliche Punktzahl lag bei 5,2 Punkten (Minimum 0 Punkte – Maximum 28 Punkte). In der Literatur wurden durchschnittliche Punktzahlen von 4,2 Punkten bzw. 4,8 Punkten beschrieben (Gladman DD et al. 1996, Gladman DD et al. 2000).

Die mit SLEDAI-2K-Score ermittelte Krankheitsaktivität wurde nach einem Vorschlag in der Literatur in drei Aktivitätsgruppen (inaktiv, milde aktiv, aktiv) eingeteilt (Chan EYT et al. 1998, Gladman DD et al. 2000). Die Krankheitsaktivität wurde bei 38 Patienten als inaktiv (1-3 Punkte), bei 55 Patienten als milde aktiv (4-7 Punkte) und bei 33 Patienten als aktiv (>7 Punkte) beurteilt.

### 2.1.2 Patienten mit Nicht-SLE-Kollagenosen

119 Patienten (103 Frauen und 16 Männer) waren an anderen Kollagenosen erkrankt. Sie stellten das Nicht-SLE-Kollagenosen-Kollektiv (NSLE-Kollagenosen-Kollektiv) dar. Das Durchschnittsalter lag bei 53,5 (22–83) Jahren. In der folgenden Tabelle sind einzelne Kollagenosen mit Patienten-Anzahl und dem Durchschnittsalter eingetragen.

<b>Tab. 2.3: Nicht-SLE-Kollagenosen</b> (eigene Darstellung)			
	<b>Patienten-Anzahl</b>	<b>% der Patientengruppe</b>	<b>Durchschnittsalter</b>
<b>CREST</b>	25	21	61,7 Jahre
<b>Dermatomyositis</b>	10	8,4	54,3 Jahre
<b>Polymyositis</b>	5	4,2	51,8 Jahre
<b>MCTD</b>	15	12,6	40,3 Jahre
<b>Sklerodermie</b>	32	26,9	55,7 Jahre
<b>Sjögren</b>	32	26,9	51,1 Jahre

### 2.1.3 Patienten mit systemischen Arthritiden

Das Kollektiv der systemischen Arthritiden umfasste 95 Patienten (62 Frauen und 33 Männer). Das Durchschnittsalter lag bei 53,1 (25–78) Jahren. Die vertretenen Erkrankungen, ihre Häufigkeit und das Durchschnittsalter der Patienten gibt die Tabelle 2.4 wieder.

<b>Tab.: 2.4: Systemische Arthritiden</b> (eigene Darstellung)			
	<b>Patienten-Anzahl</b>	<b>% der Patientengruppe</b>	<b>Durchschnittsalter</b>
<b>Rheumatoide Arthritis</b>	80	84,2	54,1 Jahre
<b>M. Still</b>	2	2,1	32 Jahre
<b>M. Bechterew</b>	6	6,3	44,8 Jahre
<b>Psoriasisarthritis</b>	7	7,4	54,9 Jahre

21 Patienten mit Rheumatoider Arthritis erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Therapie mit einem TNF- $\alpha$ -Inhibitor.

#### 2.1.4 Patienten mit primären Vaskulitiden

21 Patienten (2 Frauen und 19 Männer) gehörten zu der Gruppe der primären Vaskulitiden. Das Durchschnittsalter betrug 48,8 (25–78) Jahre. Die vertretenen Erkrankungen, ihre Häufigkeit und das Durchschnittsalter der Patienten gibt die Tabelle 2.5 wieder.

<b>Tab. 2.5:</b> Primäre Vaskulitiden (eigene Darstellung)			
	<b>Patienten-Anzahl</b>	<b>% der Patientengruppe</b>	<b>Durchschnittsalter</b>
<b>M. Wegener</b>	14	66,7	47,7 Jahre
<b>Panarteritis nodosa</b>	2	9,5	54 Jahre
<b>Mikroskopische Polyangiitis</b>	2	9,5	64 Jahre
<b>Undifferenzierte Vaskulitis</b>	3	14,3	40 Jahre

#### 2.1.5 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen

Zu dieser Gruppe gehörten weitere 40 Patienten (30 Frauen und 10 Männer) Das Durchschnittsalter betrug 50,8 (20–79) Jahre. Die vertretenen Erkrankungen, ihre Häufigkeit und das Durchschnittsalter der Patienten gibt die Tabelle 2.6 wieder.

<b>Tab. 2.6:</b> Autoimmunopathien (eigene Darstellung)			
	<b>Patienten-Anzahl</b>	<b>% der Patientengruppe</b>	<b>Durchschnittsalter</b>
<b>Autoimmunhepatitis</b>	15	37,5	50,5 Jahre
<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>	11	27,5	56,4 Jahre
<b>Thyreopathien</b>	14	35	46,8 Jahre

Von den 14 Patienten, die an einer Thyreopathie litten, waren neun Patienten an M. Basedow und fünf an Hashimoto-Thyreoiditis erkrankt.

#### 2.1.6 Patienten mit Infektionen

Das Kollektiv der infektiösen Erkrankungen (HIV und Hepatitis C) setzte sich aus 41 Patienten (10 Frauen und 31 Männern) zusammen. 19 Patienten waren HIV-positiv und 18 Patienten HCV-positiv. Vier Patienten waren sowohl HIV- als auch HCV-positiv. Bei allen Patienten waren zusätzlich zum serologischen

Befund signifikante Viruslasten nachweisbar. Das Durchschnittsalter betrug 41,5 (23–65) Jahre.

### **2.1.7 Übergreifende Kollektive**

Einige Patientenkollektive wurden zu größeren Kollektiven zusammengefasst. Das Nicht-Kollagenosen-Kollektiv (NKOLL-Kollektiv) umfasste 197 Patienten (104 Frauen und 93 Männer), die an systemischen Arthritiden, primären Vaskulitiden, infektiösen Erkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen litten. Das Durchschnittsalter in diesem Kollektiv lag bei 49,8 (20–79) Jahren. Das Nicht-SLE-Erkrankten-Kollektiv (NSLE-Erkr.-Kollektiv) zählte 316 Patienten (207 Frauen und 109 Männer) und fasst alle Erkrankten zusammen, mit Ausnahme der SLE-Patienten. Das Durchschnittsalter betrug hier 51,2 (20–83) Jahre.

### **2.1.8 Gesunde**

Das gesunde Kontrollkollektiv (GKO) wurde aus 126 Blutspendern (92 Frauen und 34 Männer) gebildet. Nach anamnestischer Befragung sowie klinischer und laborchemischer Untersuchung waren sie von den Ärzten des Instituts für Transfusionsmedizin zur Blutspende zugelassen worden. Das Durchschnittsalter lag bei 38,1 (18–78) Jahren.

## **2.2 Messung der Anti-dsDNA-AK**

Wie oben erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit fünf Tests miteinander verglichen. Der Farr-RIA wurde hierbei als Referenztest angesehen, da dieser routinemäßig zur Messung der Anti-dsDNA-AK im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster eingesetzt wurde. Gegen diesen Test wurden drei verschiedene ELISA-Tests sowie ein automatisierter FIA getestet (siehe Tabelle 2.7). Alle Assays sind in IU/ml gegen den Referenzkalibrator Wo/80 der WHO kalibriert.

**Tab. 2.7:** Übersicht über die verwendeten Assays zum Nachweis von Anti-dsDNA-AK  
(eigene Darstellung)

Hersteller	Abkürzung	Test Prinzip	Antigen	Cutoff-Wert [IU/ml]
DPC Biermann®	DPC	RIA	Rekombinante DNA	5
ORGenTec®	ORG	ELISA	Rekombinante DNA	20
Binding Site®	TBS	ELISA	Kalbsthymus DNA	75
Euroimmun®	EUR	ELISA	LachsSperma DNA	100
Pharmacia®	PHA	FIA	Rekombinante DNA	15

## 2.2.1 Farr-RIA

### 2.2.1.1 Prinzip des Farr-RIA

Das Prinzip des nach Richard Farr benannten Farr-RIA besteht darin, dass mit radioaktivem  $^{125}\text{J}$ -markierte rekombinante DNA an die Anti-dsDNA-AK, die sich im Patientenserum befinden, bindet. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat-Lösung wird die antikörpergebundene  $^{125}\text{J}$ -DNA von der nicht gebundenen getrennt, da die gebundene DNA präzipitiert. Nach Zentrifugation wird die Radioaktivität des Präzipitats im Gamma-Counter gemessen. Durch Bezugnahme auf eine im Test mitgeführte Kalibrationskurve kann die Konzentration der Anti-dsDNA-AK im Patientenserum quantitativ ermittelt werden.

### 2.2.1.2 Farr-RIA von DPC Biermann® (DPC)

25µl von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und Probe werden in Duplikaten in die vorbereiteten Röhrchen pipettiert. 200µl  $^{125}\text{J}$ -markierter humaner rekombinanter DNA werden dazu pipettiert und am Wirbelmischer gemischt. Dann folgt eine 2-stündige Inkubation bei 37°C. Nach der Inkubation werden jeweils 1000µl einer kalten Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben und die Proben erneut am Wirbelmischer durchmischt. Nach einer darauf folgenden 15-minütigen Zentrifugation bei mindestens 2000 x g saugt man den Überstand ab und der Rest wird jeweils 1 Minute im Gamma-Counter gemessen.

Um die Messung auswerten zu können, wird eine Kalibrationskurve erstellt.

Hierdurch können die Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen der Patientenseren über die berechneten Bindungswerte für diese Seren in U/ml abgelesen

werden. Die Multiplikation mit dem Faktor 2 ist notwendig, um die Konzentrationen in IU/ml angeben zu können.

Der von der Firma empfohlene obere Grenzwert des Normalbereiches beträgt 5 IU/ml.

## **2.2.2 ELISA**

### **2.2.2.1 Prinzip des ELISA**

Alle Reagenzien sowie die Patientenserumproben müssen vor dem Testbeginn Raumtemperatur angenommen haben. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit dsDNA-Ag (z. B. aus Kalbsthymus, Lachssperma oder rekombinanter DNA) beschichtet. Die Kalibratoren, verdünnte Kontrollen und Patientenproben werden in den Vertiefungen inkubiert, so dass in diesem ersten Inkubationsschritt Anti-dsDNA-AK an das immobilisierte Ag in den Vertiefungen binden können. Um ungebundene Proteine zu entfernen, werden die Vertiefungen mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird ein Enzym-Konjugat zugegeben, welches an die gebundenen humanen AK bindet. Ungebundenes Konjugat wird durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Das gebundene Konjugat wird mit Hilfe einer Chromogen-Lösung sichtbar gemacht, wobei die Farbentwicklung des Chromogens von der im Komplex gebundenen Enzymmenge abhängt und somit auch proportional zur AK-Konzentration der Probe ist. Um die Reaktion zu stoppen, wird in jede Vertiefung die im Set enthaltene Stopp-Lösung pipettiert. Die Intensität des entstandenen Reaktionsprodukts wird bei einer Wellenlänge von 450nm im Photometer gemessen.

### **2.2.2.2 ELISA von ORGenTec® (ORG)**

Vor der Messung werden die Serumproben 1:101 mit dem Probenpuffer verdünnt. Jeweils 100µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in Duplikaten werden entsprechend der Plattenbelegungen in die Mikrotiterplatten, deren Kavitäten mit humaner, rekombinanter dsDNA beschichtet sind, pipettiert. Es folgt die erste Inkubation von 30 Minuten bei

Raumtemperatur (20-28°C). Die Kavitäten werden danach entleert und sorgfältig drei Mal mit jeweils 300µl Waschpuffer gewaschen. Jeweils 100µl anti-human-IgG Meerrettich-Peroxidase werden in die Kavitäten dazu gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine weitere dreimalige Waschung mit jeweils 300µl Waschpuffer. Danach werden 100µl TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in die Kavitäten pipettiert und erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Stopp-Lösung in jede Kavität wird die Platte ca. 5 Minuten stehen gelassen.

Innerhalb der nächsten 30 Minuten wird bei einer Wellenlänge von 450nm die optische Dichte (OD) aller Proben im Plattenphotometer gemessen.

Für die Auswertung bedient man sich einer Standardgeraden. Die optischen Dichten (OD) werden auf der linearen Skala und die Konzentrationen auf der logarithmischen Skala aufgetragen. Die Punkte werden so verbunden, dass es eine Gerade ergibt. Die Konzentrationen der Anti-dsDNA-AK in den Patientenproben werden entsprechend abgelesen. Der von dem Hersteller vorgegebene Cutoff-Wert liegt bei 20 IU/ml.

### **2.2.2.3 ELISA von The Binding Site® (TBS)**

10µl jeder Probe und jeder Kontrolle werden mit 1000µl Proben-Verdünnungspuffer verdünnt (1:100) und gut gemischt. Dann werden 100µl von jedem Kalibrator, jeder verdünnten Kontrolle und Probe in Duplikaten in die dafür laut Plattenschema vorgesehenen Vertiefungen, die mit gereinigtem dsDNA-Ag aus Kalbsthymus beschichtet sind, pipettiert. Die Platten werden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann dreimal mit 300µl Waschpuffer sorgfältig gewaschen. Danach pipettiert man 100µl Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Human-IgG-Konjugat in jede Vertiefung und inkubiert weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Platte wird wieder mit dem Waschpuffer sorgfältig gewaschen. Danach werden 100µl TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in jede Vertiefung pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Phosphorsäure als Stopp-Lösung in jede Vertiefung schlägt die Farbe von blau nach gelb um. Die optische Dichte (OD) wird bei 450nm in jeder Vertiefung mit

einem Mikrotiterplatten-Reader innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmt.

Zur Auswertung erstellt man mit Hilfe der Kalibratoren eine Kalibrationskurve. Dazu wird die Anti-dsDNA-AK-Konzentration auf der logarithmischen Skala gegen die OD-Werte auf der linearen Skala für jeden Kalibrator aufgetragen. Die Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen können ohne weitere Berücksichtigung der Verdünnung aus der Kalibrationskurve direkt abgelesen werden.

Die Interpretation der Werte ist von der Firma wie folgt vorgegeben:

< 30 IU/ml	negativ
30 – 75 IU/ml	grenzwertig
> 75 IU/ml	positiv

#### **2.2.2.4 ELISA von Euroimmun® (EUR)**

Die zu untersuchenden Serumproben werden im Verhältnis 1:201 verdünnt. Anschließend werden entsprechend dem Pipettierschema je 100µl Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen oder verdünnte Serumproben in Duplikaten in die einzelnen Reagenzgefäße, die mit gereinigtem dsDNA-Ag aus Lachssperma beschichtet sind, pipettiert. Die Inkubation dauert bei Raumtemperatur 30 Minuten. Die Reagenzgefäße werden entleert und anschließend dreimal mit jeweils 300µl Waschpuffer gründlich gewaschen. In einem weiteren Schritt werden jeweils 100µl Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Human-IgG-Konjugat dazupipettiert und ebenfalls bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Nach dem erneuten Waschen werden in die Reagenzgefäße jeweils 100µl Tetramethylenbenzidin/Wasserstoffperoxid-Lösung pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 Minuten inkubiert. Jeweils 100µl Phosphorsäure als Stopp-Lösung werden dazugegeben. Die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 620nm wird innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen durchgeführt.

Die gemessenen Extinktionswerte der drei Kalibrationsseren werden gegen die entsprechenden Einheiten (linear/linear) aufgetragen. Aus der entstandenen Standardkurve lassen sich die Konzentrationen der AK in den Serumproben



ablesen. Der von der Firma empfohlene obere Grenzwert des Normalbereiches beträgt 100 IU/ml.

## **2.2.3 FIA**

### **2.2.3.1 Prinzip des FIA**

Einzelne Wells sind mit definierten Ag beschichtet. Diese werden von den spezifischen AK im Patientenserum gebunden. Die gebundenen Immunglobuline werden mit einem Sekundärantikörper (anti-human IgG), dessen gekoppeltes Enzym ein fluoreszierendes Substrat umsetzt, nachgewiesen. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur gebundenen Antikörpermenge und wird in IU/ml umgerechnet.

### **2.2.3.2 FIA von Pharmacia® (PHA)**

Es handelt sich hierbei um ein vollautomatisches Testsystem (UniCAP 100), das alle notwendigen Schritte inklusive Probenverdünnung, Pipettiervorgänge, Inkubationen, Waschschriffe und Messungen selbsttätig durchführt. Das Gerät wird zuvor mit den Proben, Qualitätskontrollen und den Reagenzien bestückt. Für eine Verdünnung benötigt das System 9µl Serum bei einem vorgelegten Mindestvolumen von 100µl Serum. Als Ag wird rekombinante zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA aus Escherichia coli und als Konjugat anti-human IgG, das mit Galactosidase gekoppelt ist, eingesetzt. Die Galactosidase spaltet in der Nachweisreaktion das Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-Galactosid.

Die Auswertung erfolgt automatisch und wird vom Gerät selbsttätig ausgedruckt. Die Grenzen befinden sich zwischen 10 und 15 IU/ml.

<10 IU/ml	negativ
10 – 15 IU/ml	grenzwertig
>15 IU/ml	positiv

## 2.3 Bestimmung von ANA mittels indirekter Immunfluoreszenz

### 2.3.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (IFT)

Die HEp2-Zellen sind auf Objektträgern fixiert. Durch Überschichtung der Objektträger mit einer geeigneten Probenverdünnung des zu testenden Serums binden eventuell vorhandene AK. Diese werden in einem zweiten Schritt durch mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Antihumanglobulin im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

### 2.3.2 IFT

Anafluor HEp2 Kit von Innogenetics®

Verwendete Bestandteile:

- Objektträger mit fixierten HEp2 Zellen
- ANA positives Kontrollserum, homogenes Muster, human, gebrauchsfertig
- ANA schwach positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig
- ANA negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig
- Phosphatpuffer (PBS), Inhalt einer Tüte in 1000ml Aqua dest. lösen
- Eindeckmedium mit Ausbleichschutz, flüssig, gebrauchsfertig

Anti-human IgG FITC von DAKO®

Verwendete Bestandteile:

- Antihumanglobulin vom Kaninchen, FITC markiert, IgG spezifisch, Fab-Fragmente, Konzentrat 1:60 mit PBS verdünnen

Vor Gebrauch werden alle Reagenzienkomponenten und die Testseren auf Raumtemperatur gebracht und das Probenmaterial 1:80 mit PBS verdünnt.

1-2 Tropfen (ca. 20-40µl) verdünnten Serums bzw. Kontrollserums werden auf je ein Testfeld gegeben. Die Felder müssen vollständig bedeckt sein und dürfen bis zum Ende der Durchführung nicht austrocknen. Es folgt eine 30 Minuten lange Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Danach werden

die Objektträger vorsichtig einzeln mit PBS abgespült, 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen, vorsichtig bewegt und der Puffer wird gewechselt. Die Objektträger werden einzeln abgearbeitet, indem die überschüssige Flüssigkeit abgeklopft wird (nicht austrocknen lassen). In einem weiteren Schritt werden 1-2 Tropfen (ca. 20-40µl) Konjugat (Antihumanglobulin) auf jedes Testfeld gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer dunkel inkubiert. Objektträger werden erneut vorsichtig einzeln mit PBS abgespült, 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen und vorsichtig bewegt. Der Puffer wird gewechselt. Überschüssige Flüssigkeit wird abgeklopft. Auf jedes Testfeld wird ein kleiner Tropfen Eindeckmedium gegeben und eingedeckt.

Die folgende Fluoreszenzmikroskopie erfolgt mit EUROStar I mit LED-Beleuchtung. Es wird mit Objektiv CP „Achromat“ 40x und Okular 10x mikroskopiert.

Die mit den verdünnten Proben inkubierten HEP2-Zellen werden hinsichtlich der Fluoreszenzintensität im Vergleich mit den Positiv- und Negativkontrollseren als positiv oder negativ beurteilt. Bei positiven Proben wird zudem das Fluoreszenzmuster (Zellkern, Zytoplasma, Chromosomen in Metaphase) erfasst. Die folgenden nukleären Fluoreszenzmuster werden unterschieden:

- Homogen
- gesprenkelt (fein oder grob)
- nukleolär
- peripher (nuclear rim)
- Kernmembran
- nukleäre Tupfen (nuclear dots)
- Zentromere

Von Bedeutung ist ferner die Beurteilung der Anfärbung der Chromosomen in der Metaphase.

Im Zytoplasma werden folgende Fluoreszenzmuster unterschieden:

- Mitochondrien
- Ribosomen
- Lysosomen
- Golgi-Apparat
- Aktin
- Vimentin

## **2.4. Nephelometrische Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4**

### **2.4.1 Prinzip der Nephelometrie**

Die grundlegende Reaktion bei der nephelometrischen Messung am BN II ist eine Ag-AK-Reaktion. Die für die Proteinbestimmung eingesetzten Antiseren stellen ein Gemisch spezifischer AK dar, die gegen verschiedene Epitope des zu bestimmenden Proteins (Ag) gerichtet sind. Dadurch kann bei der Ag-AK-Reaktion ein dreidimensionaler vernetzter Ag-AK-Komplex entstehen. Bei der nephelometrischen Messung am BN II (Fa. Dade Behring®, Marburg) wird mit einer Leuchtdiode ein Lichtstrahl erzeugt, der durch die Messküvette geschickt wird. Das Licht, das an den Ag-AK-Komplexen gestreut wird, wird über ein Linsensystem auf einer Photodiode fokussiert. Das fokussierte Streulichtsignal wird dann in ein elektrisches digitales Signal umgewandelt. Die so gemessene Intensität des Streulichtes ist unter abgestimmten Bedingungen proportional der Menge der Ag-AK-Komplexe in der Probe. Bei der Messung am BN II wird die AK-Menge (Antiserum) in konstanter Konzentration eingesetzt. Somit ist das Messsignal proportional zur Antigenmenge. Anhand einer Referenzkurve, die man mit einem definierten Standard erstellt, kann so die genaue Antigenmenge bestimmt werden.

## 2.4.2 Nephelometer BN II von Dade Behring®

Für die immunnephelometrische Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 wurde das vollautomatisierte Nephelometer BN II von Fa. Dade Behring® entsprechend den Herstellerangaben mit den Herstellerreagenzien eingesetzt. Der Messbereich für C3c beträgt 12 bis 410 mg/dl, entsprechend für C4 6 bis 190 mg/dl. Die Komplementkonzentrationen, der in die Studie eingeschlossenen Proben, wurden im Rahmen der Routinediagnostik jeweils aus frischem Material bestimmt.

## 2.5 Statistische Methoden

### 2.5.1 Diagnostische Sensitivität, Spezifität, Effizienz und prädiktive Werte

Zur Ermittlung der diagnostischen Testqualität wurden die diagnostische Sensitivität, Spezifität, Effizienz und die prädiktiven Werte berechnet. Dazu wurden primär die von den Herstellern vorgegebenen Schwellenwerte (Cutoff-Werte) herangezogen.

In den folgenden Definitionen der statistischen Testparameter sind die verwendeten Begriffe wie folgt festgelegt:

**richtig-positiv (RP):** Anzahl der Messungen, in denen ein positiver Befund vom Test korrekt als positiv angezeigt wird.

**richtig-negativ (RN):** Anzahl der Messungen, in denen ein negativer Befund vom Test korrekt als negativ angezeigt wird.

**falsch-positiv (FP):** Anzahl der Messungen, in denen ein negativer Befund vom Test nicht korrekt als positiv angezeigt wird.

**falsch-negativ (FN):** Anzahl der Messungen, in denen ein positiver Befund vom Test nicht korrekt als negativ angezeigt wird.

**Gesamtkollektiv (GK):** Anzahl aller Messungen

Die statistischen Testparameter sind folgendermaßen definiert:

**Diagnostische Sensitivität:** Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird.

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{\text{RP}}{\text{RP} + \text{FN}}$$

**Diagnostische Spezifität:** Wahrscheinlichkeit, mit der ein nicht Kranker als nicht krank erkannt wird.

$$\text{Diagnostische Spezifität} = \frac{\text{RN}}{\text{RN} + \text{FP}}$$

**Diagnostische Effizienz:** Eine hohe Effizienz bedeutet, dass auch eine kleine Stichprobe einen brauchbaren Schätzwert liefert.

$$\text{Diagnostische Effizienz} = \frac{\text{RP} + \text{RN}}{\text{GK}}$$

**Positiv prädiktiver Wert:** Wahrscheinlichkeit, mit der eine Erkrankung vorliegt, wenn der Test positiv ist.

$$\text{positiv prädiktiver Wert} = \frac{\text{RP}}{\text{RP} + \text{FP}}$$

**Negativ prädiktiver Wert:** Wahrscheinlichkeit, mit der eine Erkrankung nicht vorliegt, wenn der Test negativ ist.

$$\text{negativ prädiktiver Wert} = \frac{\text{RN}}{\text{RN} + \text{FN}}$$

### 2.5.2 Receiver Operating Characteristic Kurvenanalyse (ROC)

Mit Hilfe der ROC-Analyse kann die Sensitivität und Spezifität eines Tests bei verschiedenen Cutoff-Werten ermittelt werden. Bei der grafischen Darstellung der oben genannten Validitätsmaße entsteht eine sogenannte ROC-Kurve. Hierbei wird die Sensitivität gegen 1 minus Spezifität in einem Graphen

dargestellt. Durch eine „area under curve“ Analyse (AUC) wird der optimale Cutoff-Wert ermittelt. Bei diesem Wert ist die Summe aus Spezifität und Sensitivität am größten und somit auch der diagnostische Wert. Mit Hilfe der ROC-Kurvenanalyse besteht also die Möglichkeit, die Fähigkeit eines Assays in der Unterscheidung der kranken Fälle von den gesunden Fällen zu bewerten. Weiterhin ist es möglich, die diagnostische Leistung zweier oder mehrerer diagnostischer Assays zu vergleichen. Besteht eine perfekte Aufteilung der Assaywerte, so ist die AUC gleich 1. Wenn das Konfidenzintervall (CI) der AUC den Wert 0,5 nicht enthält, ist das ein Beweis dafür, dass der Assay in der Lage ist, zwischen gesunden und kranken Fällen zu unterscheiden (Metz CE 1978, Zweig MH, Campbell G 1993).

### **2.5.3 Statistische Tests**

Zur statistischen Auswertung wurde der ungepaarte T-Test nach vorheriger Testung auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  ausgewählt. Die Durchführung der statistischen Tests erfolgte mit der Software MedCalc® 6.0. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Microsoft-Excel®.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeine diagnostische Sensitivität

Die quantitative Bestimmung der Anti-dsDNA-AK wurde mit fünf Assays (drei ELISA, einem Farr-RIA und einem FIA) durchgeführt. Anzahl und Prozentsätze der positiven Testergebnisse für jedes Studienkollektiv sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

<b>Tab. 3.1:</b> Prävalenz der Anti-dsDNA-AK bei verschiedenen Studienkollektiven (Cutoff-Wert der Hersteller) (eigene Darstellung)											
Kollektiv	Anzahl n	DPC		ORG		TBS		EUR		PHA	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>SLE</b>	<b>126</b>	<b>90</b>	<b>71,4</b>	<b>98</b>	<b>78,4<sup>(1)</sup></b>	<b>52</b>	<b>41,3</b>	<b>58</b>	<b>46</b>	<b>48</b>	<b>38,4<sup>(1)</sup></b>
<b>GKO</b>	<b>126</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>7,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>
<b>NSLE-Koll.</b>	<b>119</b>	<b>7</b>	<b>5,9<sup>(1)</sup></b>	<b>34</b>	<b>29,6<sup>(4)</sup></b>	<b>4</b>	<b>3,4</b>	<b>13</b>	<b>10,9</b>	<b>4</b>	<b>3,4</b>
PSS	32	1	3,1	5	15,6	0	0	4	12,5	0	0
CREST	25	1	4	6	25 <sup>(1)</sup>	1	4	5	20	1	4
DM	10	0	0 <sup>(1)</sup>	4	40	0	0	0	0	0	0
PM	5	0	0	3	60	1	20	0	0	1	20
MCTD	15	3	20	6	40	2	13,3	3	20	2	13,3
Sjögren	32	2	6,3	10	34,5 <sup>(3)</sup>	0	0	1	3,1	0	0
<b>Syst. Arthr.</b>	<b>95</b>	<b>8</b>	<b>8,5<sup>(1)</sup></b>	<b>20</b>	<b>21,1</b>	<b>2</b>	<b>2,1</b>	<b>1</b>	<b>1,1</b>	<b>4</b>	<b>4,2</b>
RA	80	6	7,5	18	22,5	2	2,5	1	1,3	4	5
Still	2	0	0	1	50	0	0	0	0	0	0
Bechterew	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PsoA	7	2	33,3 <sup>(1)</sup>	1	14,3	0	0	0	0	0	0
<b>Prim. Vask.</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>4,8</b>	<b>2</b>	<b>9,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4,8</b>
Vask.	3	1	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0
PAN	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mPAN	2	0	0	1	50	0	0	0	0	0	0
Wegener	14	0	0	1	7,1	0	0	0	0	1	7,1
<b>Infekt.</b>	<b>41</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>2,4</b>	<b>1</b>	<b>2,4</b>	<b>1</b>	<b>2,4</b>
HepC	18	0	0	2	11,1	1	5,6	1	5,6	1	5,6
HIV	19	0	0	7	36,8	0	0	0	0	0	0
HepC+HIV	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>AI-Pathien</b>	<b>40</b>	<b>2</b>	<b>5,1<sup>(1)</sup></b>	<b>11</b>	<b>27,5</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
AIH	15	2	13,3	7	46,7	4	26,7	2	13,3	0	0
PBC	11	0	0 <sup>(1)</sup>	2	18,2	0	0	0	0	0	0
SD	14	0	0	2	14,3	0	0	0	0	0	0
<b>NKOLL</b>	<b>197</b>	<b>11</b>	<b>5,6<sup>(2)</sup></b>	<b>42</b>	<b>21,3</b>	<b>7</b>	<b>3,6</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
<b>NSLE-Erkr.</b>	<b>316</b>	<b>18</b>	<b>5,8<sup>(3)</sup></b>	<b>76</b>	<b>24,4<sup>(4)</sup></b>	<b>11</b>	<b>3,5</b>	<b>17</b>	<b>5,4</b>	<b>10</b>	<b>3,2</b>
<b>AKO</b>	<b>442</b>	<b>18</b>	<b>4,1<sup>(3)</sup></b>	<b>85</b>	<b>19,4<sup>(4)</sup></b>	<b>11</b>	<b>2,5</b>	<b>17</b>	<b>3,8</b>	<b>11</b>	<b>2,5</b>

<sup>(1)</sup> bei einem Patienten konnte mit dem entsprechenden Assay kein Messwert bestimmt werden.

<sup>(2)</sup> bei zwei Patienten konnte mit dem entsprechenden Assay kein Messwert bestimmt werden.

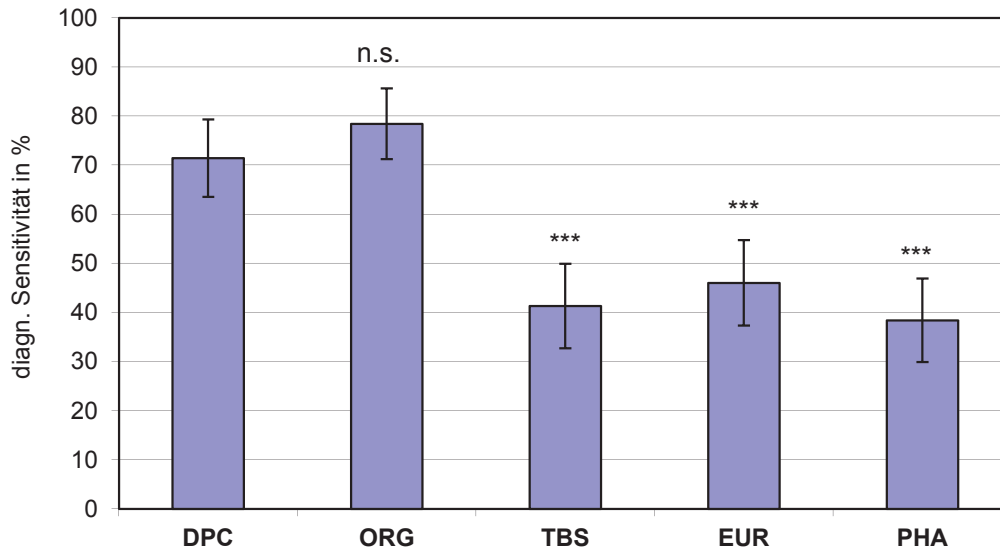
<sup>(3)</sup> bei drei Patienten konnte mit dem entsprechenden Assay kein Messwert bestimmt werden.

<sup>(4)</sup> bei vier Patienten konnte mit dem entsprechenden Assay kein Messwert bestimmt werden.



Die größte diagnostische Sensitivität für SLE erreichten die Assays ORG mit 78,4% und DPC mit 71,4%. TBS, EUR und PHA zeigten im Vergleich signifikant geringere Werte.

**Abb. 3.1:** Diagnostische Sensitivität für den Nachweis von Anti-dsDNA-AK

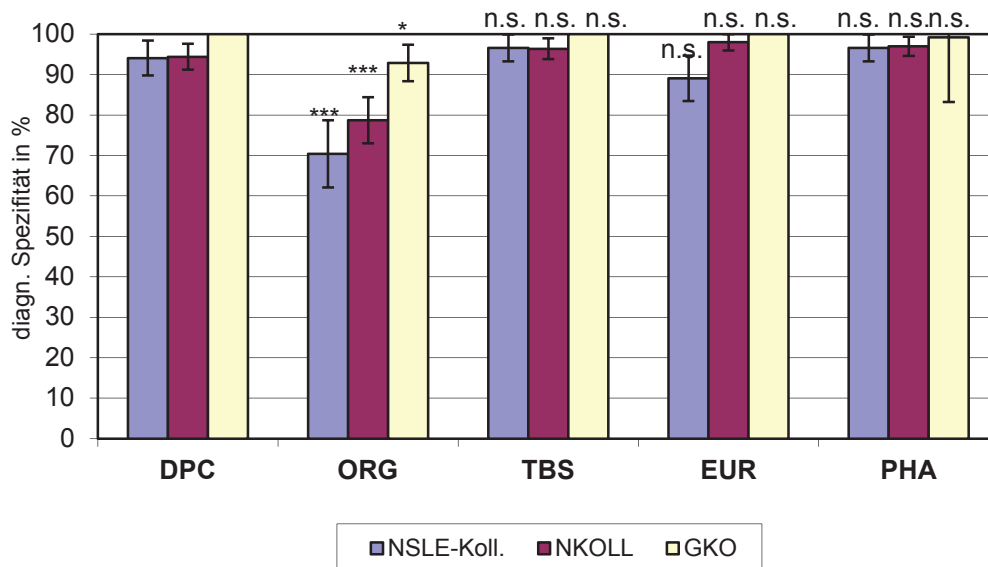


Signifikanz vs. DPC: \*\*\*  $p < 0,0005$ ; n.s.: nicht signifikant  
 | 95% CI

### 3.2 Allgemeine diagnostische Spezifität

Alle fünf Assays wiesen eine hohe diagnostische Spezifität (92,9 bis 100,0%) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (GKO) auf. Vier der fünf Assays (DPC, TBS, EUR und PHA) erreichten auch im Vergleich des SLE-Kollektivs mit den Patientenkontrollkollektiven (NSLE-Koll., NKOLL) eine hohe diagnostische Spezifität (89,1 bis 98%). Dem gegenüber war die diagnostische Spezifität des Assays ORG im Vergleich dieser Kollektive signifikant geringer. Die diagnostische Spezifität der Assays TBS und PHA veränderte sich nicht signifikant in Abhängigkeit vom betrachteten Kontrollkollektiv. Im Gegensatz dazu ergaben sich signifikante Abnahmen der Spezifität bei den Assays DPC (NSLE-Koll. vs. GKO und NKOLL vs. GKO mit jeweils  $p = 0,019$ ), bei ORG (NSLE-Koll. vs. GKO mit  $p < 0,0005$ , NKOLL vs. GKO mit  $p = 0,0013$ ) und bei EUR (NSLE-Koll. vs. NKOLL mit  $p = 0,0022$  und NSLE-Koll. vs. GKO mit  $p < 0,0005$ ).

**Abb. 3.2:** Diagnostische Spezifität beim Nicht-SLE-Kollagenose-Kollektiv, Nicht-Kollagenose-Kollektiv und bei Gesunden



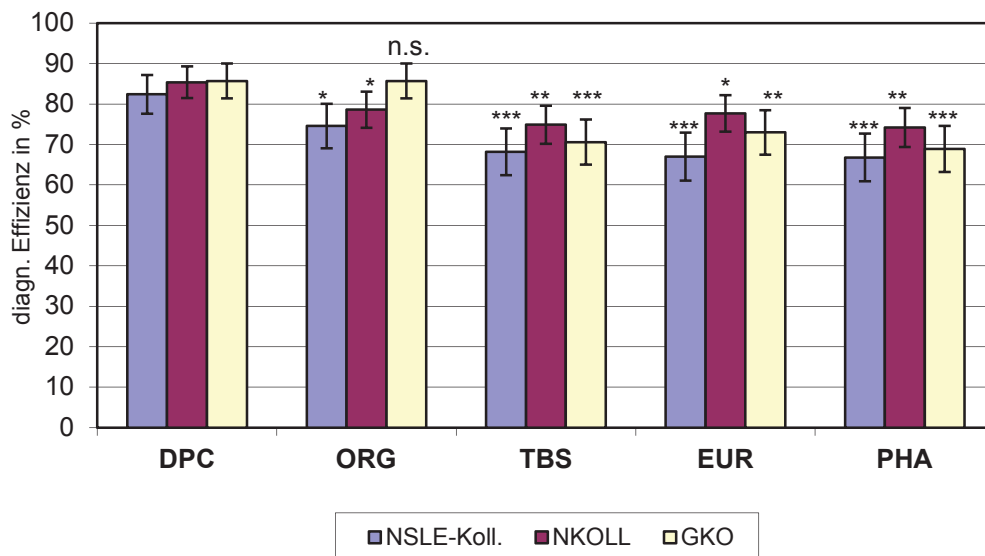
Signifikanz vs. DPC: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; n.s.: nicht signifikant  
 [ 95% CI

<b>Tab. 3.2:</b> Diagnostische Spezifität in % (eigene Darstellung)					
Vergleichskollektiv	DPC	ORG	TBS	EUR	PHA
NSLE-Koll.	94,1	70,4	96,6	89,1	96,6
NKOLL	94,4	78,7	96,4	98	97
GKO	100	92,9	100	100	99,2

### 3.3 Diagnostische Effizienz

Die diagnostische Effizienz war für den Assay DPC signifikant höher als für die vier Vergleichsassays (82,4 bis 85,7%). Lediglich in Bezug auf die Kontrollgruppe GKO erreichte der Assay ORG eine mit DPC vergleichbare diagnostische Effizienz. Signifikante Unterschiede der diagnostischen Effizienz in Abhängigkeit vom betrachteten Kontrollkollektiv wurden für den Assay ORG (NSLE-Koll. vs. GKO  $p = 0,0037$  und NKOLL vs. GKO  $p = 0,0404$ ) und bei EUR (NSLE-Koll. vs. NKOLL  $p = 0,0062$ ) beobachtet.

**Abb. 3.3:** Diagnostische Effizienz beim Nicht-SLE-Kollagenose-Kollektiv, Nicht-Kollagenose-Kollektiv und bei Gesunden



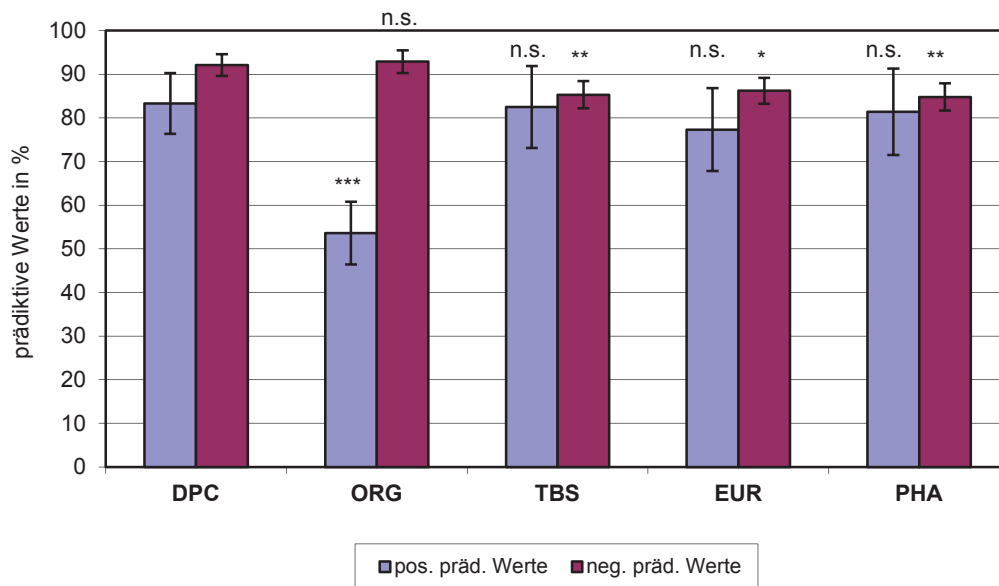
Signifikanz vs. DPC für jede Kontrollgruppe: \* p<0,05; \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005; n.s. nicht signifikant  
 [ 95% CI

<b>Tab. 3.3:</b> Diagnostische Effizienz in % (eigene Darstellung)					
Vergleichskollektiv	DPC	ORG	TBS	EUR	PHA
NSLE-Koll.	82,4	74,6	68,2	67	66,8
NKOLL	85,4	78,6	74,9	77,7	74,2
GKO	85,7	85,7	70,6	73	68,9

### 3.4 Prädiktive Werte

Die prädiktiven Werte wurden gegen das gesamte Kontrollkollektiv (AKO n=442) ermittelt. Die positiv prädiktiven Werte waren bei den Assays DPC, TBS, PHA vergleichbar hoch (77,3 bis 83,3%) und signifikant höher als bei ORG. DPC und ORG wiesen signifikant höhere negativ prädiktive Werte (91,1 bis 92,9%) im Vergleich zu den drei Assays TBS, EUR und PHA auf.

**Abb. 3.4:** Positiv und negativ prädiktive Werte vs. das gesamte Kontrollkollektiv



Signifikanz jeweils vs. DPC: \* p<0,05; \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005; n.s. nicht signifikant  
 [ 95% CI

<b>Tab. 3.4:</b> Prädiktive Werte in % (eigene Darstellung)					
	DPC	ORG	TBS	EUR	PHA
<b>positiv präd. Werte</b>	83,3	53,6	82,5	77,3	81,4
<b>negativ präd. Werte</b>	92,1	92,9	85,3	86,2	84,8

### 3.5 Relative Erhöhung der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in drei Studienkollektiven

Alle fünf Assays sind gegen den Referenzkalibrator Wo/80 der WHO kalibriert und sollten theoretisch gleich hohe Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen messen. Aus den unterschiedlichen Cutoff-Werten der Hersteller lässt sich jedoch erkennen, dass dies praktisch nicht erreicht wird. Somit lässt sich aus den absoluten Konzentrationen keine genaue Aussage treffen, wie stark erhöht die gemessenen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen tatsächlich sind. Mit Hilfe der relativen Erhöhung ist es möglich, unter Berücksichtigung der individuellen Cutoff-Werte der Hersteller, die Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen zu „normalisieren“ und miteinander vergleichbar zu machen.

Alle Assays zeigten bei den Testpositiven des SLE-Kollektivs die stärksten relativen Erhöhungen der medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen über die

Cutoff-Werte der Hersteller. Die Unterschiede der medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen im SLE-Kollektiv waren im Vergleich zu den anderen beiden Studienkollektiven (NSLE-Koll.- und NKOLL-Kollektiv) bei DPC und ORG am deutlichsten ausgeprägt.

<b>Tab. 3.5:</b> Relative Erhöhung des Anti-dsDNA-AK-Spiegels in Testpositiven (eigene Darstellung)			
<b>Assay</b>	<b>Kollektiv</b>	<b>Anzahl n</b>	<b>x-fache Erhöhung</b>
<b>DPC</b>	SLE	90	<b>4,4</b>
	NSLE-Koll.	7	<b>1,6</b>
	NKOLL	11	<b>1,7</b>
<b>ORG</b>	SLE	98	<b>3,6</b>
	NSLE-Koll.	34	<b>1,4</b>
	NKOLL	42	<b>1,4</b>
<b>TBS</b>	SLE	52	<b>3,0</b>
	NSLE-Koll.	4	<b>2,4</b>
	NKOLL	7	<b>2,3</b>
<b>EUR</b>	SLE	58	<b>2,4</b>
	NSLE-Koll.	13	<b>1,8</b>
	NKOLL	4	<b>2,1</b>
<b>PHA</b>	SLE	48	<b>2,6</b>
	NSLE-Koll.	4	<b>2,1</b>
	NKOLL	6	<b>1,8</b>

### 3.6 Konkordanz

Das Ausmaß der qualitativen Testübereinstimmung wird mit Hilfe der prozentualen Konkordanz überprüft. Die höchste Konkordanz von 94,4% zeigten TBS und EUR. ORG zeigte im Vergleich mit allen anderen Assays jeweils die geringste Konkordanz.

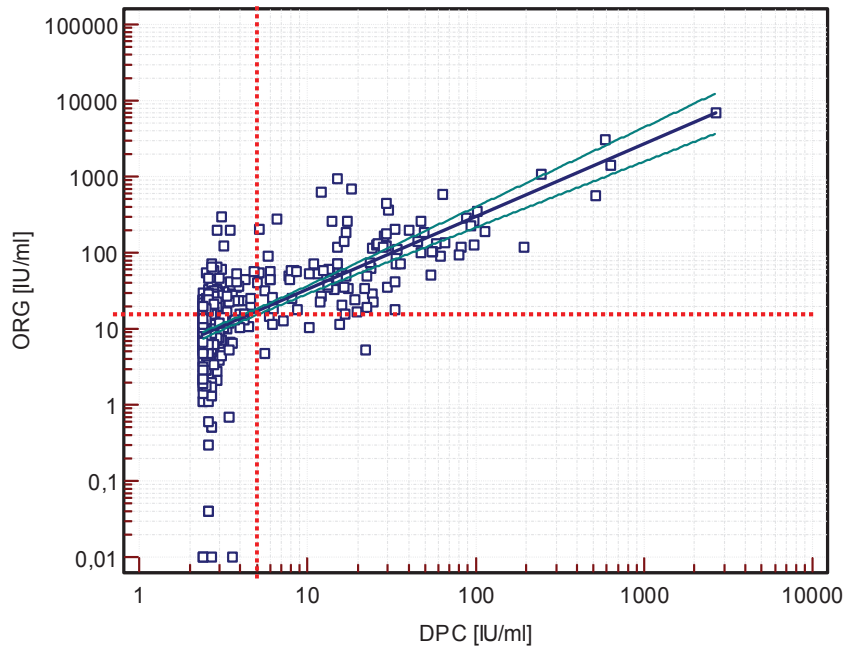
<b>Tab. 3.6:</b> Prozentuale Konkordanz (eigene Darstellung)					
	<b>DPC</b>	<b>ORG</b>	<b>TBS</b>	<b>EUR</b>	<b>PHA</b>
<b>DPC</b>	---	81,8	88,5	88,8	87,9
<b>ORG</b>	<b>81,8</b>	---	78,7	77,4	77,4
<b>TBS</b>	<b>88,5</b>	<b>78,7</b>	---	94,4	92,2
<b>EUR</b>	<b>88,8</b>	<b>77,4</b>	<b>94,4</b>	---	89,4
<b>PHA</b>	<b>87,9</b>	<b>77,4</b>	<b>92,2</b>	<b>89,4</b>	---

### 3.7 Korrelation der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen

Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen, die mit den fünf Assays gemessen wurden, konnten aufgrund der Kalibrierung gegen den Referenzkalibrator Wo/80 der WHO miteinander verglichen werden. Sie zeigten untereinander eine statistisch signifikante ( $p < 0,0001$ ) Korrelation. Es folgen Punktwolkendiagramme, in denen die Testergebnisse von DPC als Bezugsassay und jeweils einem weiteren Assay gegenübergestellt sind.

### Abb. 3.5: Korrelation ORG vs. DPC

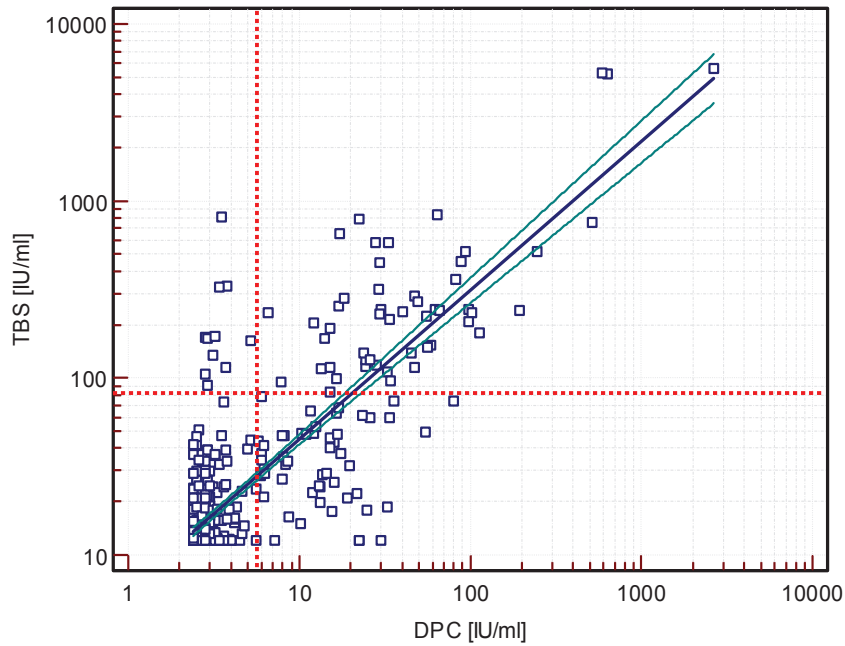
Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = 0,65$       CI (95%): 0,60 bis 0,69      Geradengleichung  $\log(y) = 0,56 + 0,96 \log(x)$

### Abb. 3.6: Korrelation TBS vs. DPC

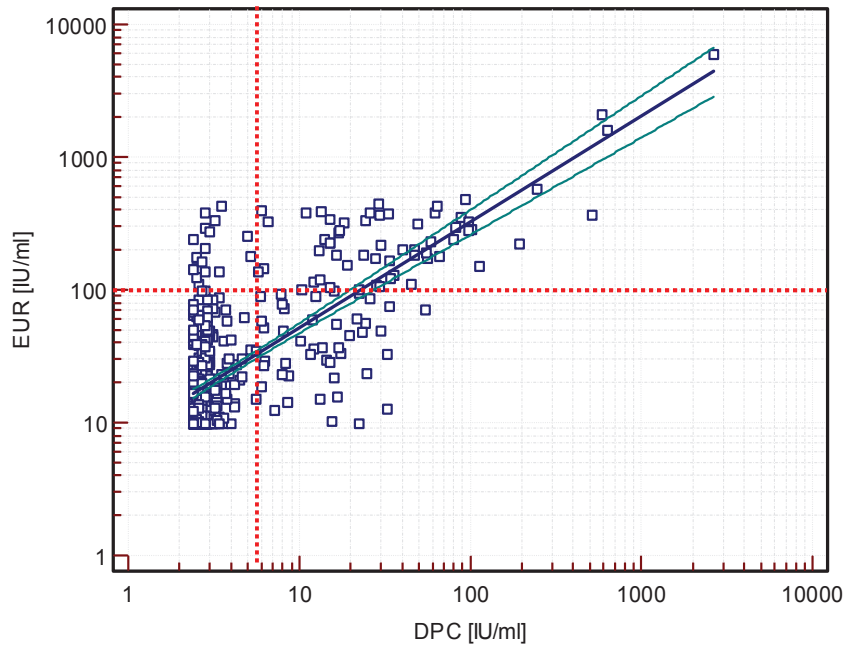
Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = 0,82$       CI (95%): 0,79 bis 0,84      Geradengleichung:  $\log(y) = 0,81 + 0,84 \log(x)$

### Abb. 3.7: Korrelation EUR vs. DPC

Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



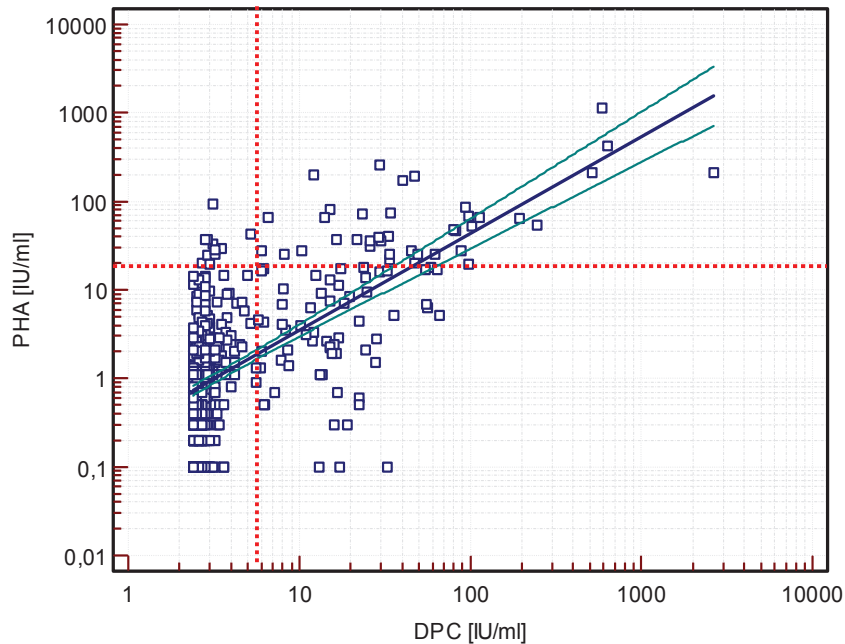
$r = 0,71$

CI (95%): 0,67 bis 0,75

Geradengleichung:  $\log(y) = 0,92 + 0,80 \log(x)$

### Abb. 3.8: Korrelation PHA vs. DPC

Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = 0,61$

CI (95%): 0,56 bis 0,66

Geradengleichung:  $\log(y) = -0,55 + 1,09 \log(x)$



In der folgenden Tabelle sind die Korrelationskoeffizienten und 95%-Konfidenzintervalle für alle Assaypaare dargestellt. Die stärkste Korrelation mit  $r=0,82$  zeigten im Vergleich die Assays DPC und TBS. Insgesamt wies PHA im Vergleich mit allen anderen Assays die geringste Korrelation ( $0,59 < r < 0,66$ ) auf.

<b>Tab. 3.7: Korrelation</b> (eigene Darstellung)						
		<b>DPC</b>	<b>ORG</b>	<b>TBS</b>	<b>EUR</b>	<b>PHA</b>
<b>DPC</b>	r		0,65	0,82	0,71	0,61
	CI (95%)	---	0,60 bis 0,69	0,79 bis 0,84	0,67 bis 0,75	0,56 bis 0,66
<b>ORG</b>	r	<b>0,65</b>		0,71	0,68	0,66
	CI (95%)	0,60 bis 0,69	---	0,66 bis 0,75	0,63 bis 0,72	0,61 bis 0,70
<b>TBS</b>	r	<b>0,82</b>	<b>0,71</b>		0,79	0,64
	CI (95%)	0,79 bis 0,84	0,66 bis 0,75	---	0,76 bis 0,82	0,58 bis 0,68
<b>EUR</b>	r	<b>0,71</b>	<b>0,68</b>	<b>0,79</b>		0,59
	CI (95%)	0,67 bis 0,75	0,63 bis 0,72	0,76 bis 0,82	---	0,54 bis 0,64
<b>PHA</b>	r	<b>0,61</b>	<b>0,66</b>	<b>0,64</b>	<b>0,59</b>	
	CI (95%)	0,56 bis 0,66	0,61 bis 0,70	0,58 bis 0,68	0,54 bis 0,64	---

### 3.8 Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität

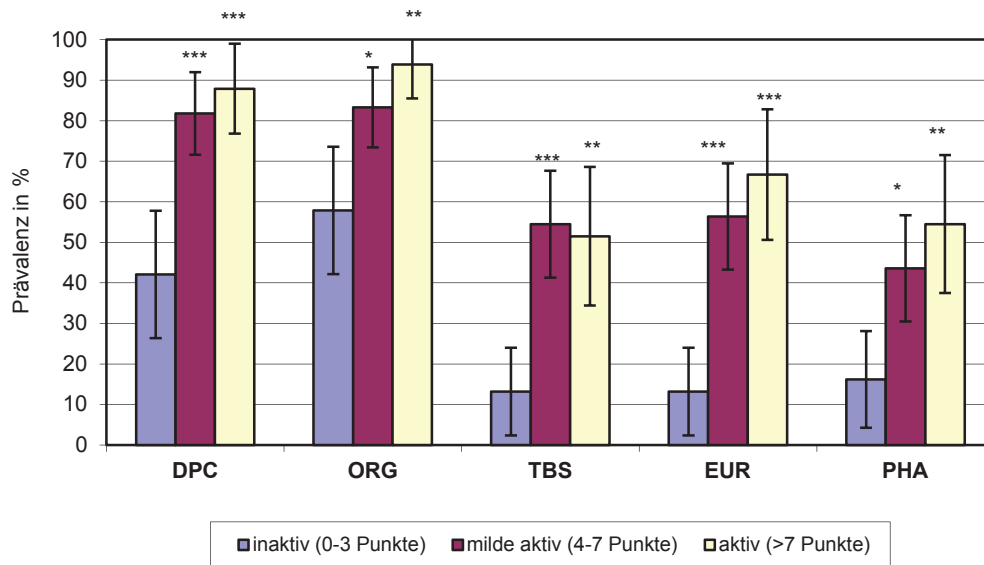
Im Weiteren untersuchten wir die Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität, die mit Hilfe des SLEDAI-2K-Scores bestimmt wurde. Demnach wurde die Krankheitsaktivität bei 38 Patienten als inaktiv (1-3 Punkte), bei 55 Patienten als milde aktiv (4-7 Punkte) und bei 33 Patienten als aktiv (>7 Punkte) beurteilt.

#### 3.8.1 Prävalenz von Anti-dsDNA-AK

Alle fünf Assays zeigten einen signifikanten Anstieg der Prävalenz bei dem Vergleich zwischen inaktivem und milde aktivem/aktivem SLE (siehe Abb. 3.9). Die höchste Prävalenz wiesen bei inaktivem SLE die Assays ORG mit 57,9% und DPC mit 42,1% auf. Bei den anderen Assays lag die Prävalenz von Anti-dsDNA-AK in diesem Teilkollektiv jeweils deutlich unter 20%. Die Prävalenzunterschiede zwischen milde aktivem und aktivem SLE waren gering

und erreichten nicht das Signifikanzniveau. Die Prävalenz war in diesen Teilkollektiven nicht signifikant höher als in dem gesamten SLE-Kollektiv, wobei eine Tendenz in der Teilgruppe des aktiven SLE bei den Assays DPC ( $p=0,0891$ ), ORG ( $p=0,0776$ ) und EUR ( $p=0,0565$ ) zu erkennen war (siehe Abb. 3.1).

**Abb. 3.9:** Prävalenz von Anti-dsDNA-AK bezüglich der SLE-Krankheitsaktivität



Signifikanz vs. „inaktiv“ für jeden Assay: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,005$ ; \*\*\* $p<0,0005$   
 [ 95% CI

### 3.8.2 Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen

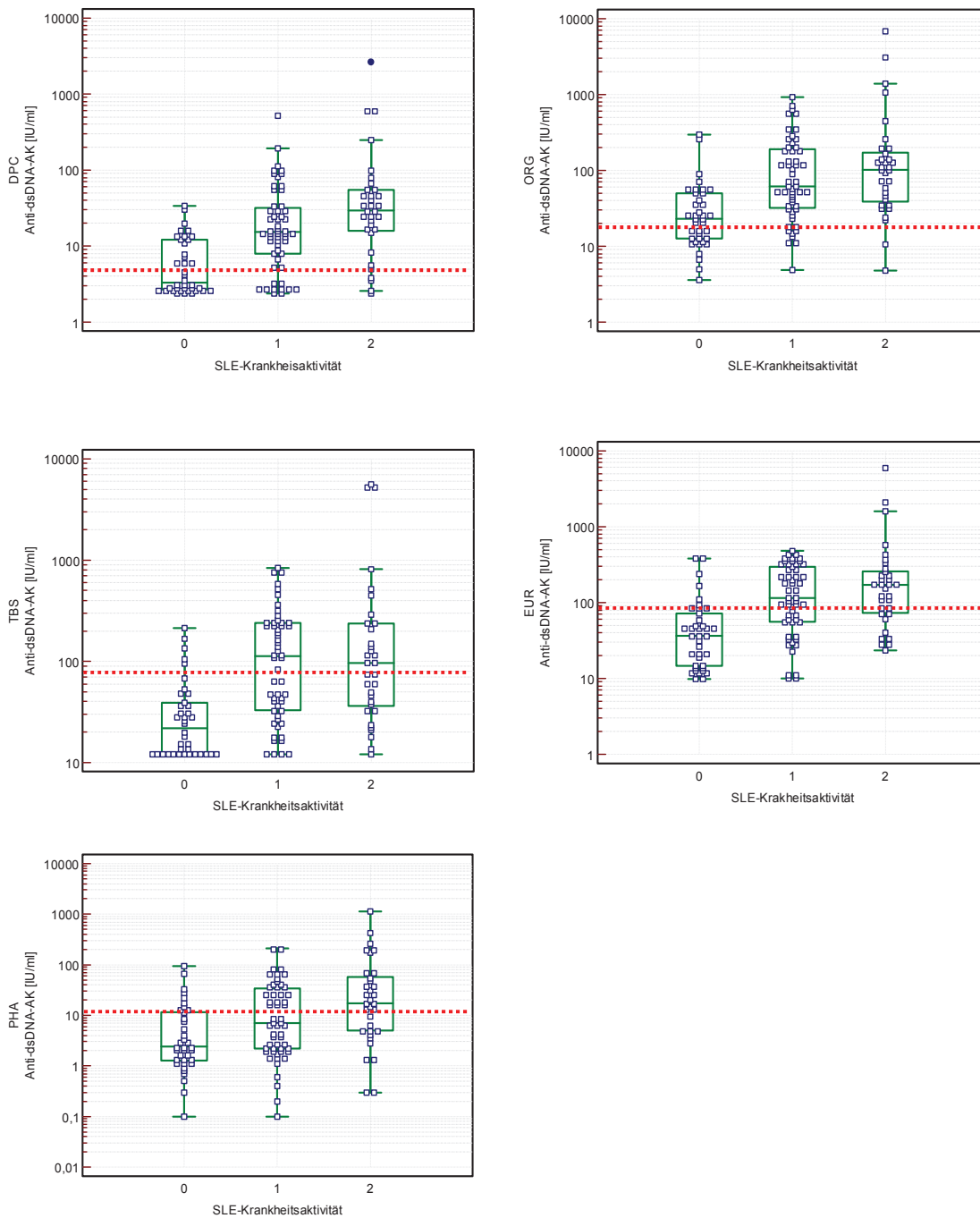
In den folgenden Abbildungen ist die Verteilung der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in den drei Aktivitätsgruppen (0: „inaktiv“, 1: „milde aktiv“, 2: „aktiv“) bei den SLE-Patienten dargestellt. Bei ORG wurden in allen drei Aktivitätsgruppen erhöhte mediane Werte gemessen. Die mit DPC, TBS und EUR gemessenen medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen überstiegen in den Aktivitätsgruppen 1 und 2 den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers. PHA zeigte lediglich in der Aktivitätsgruppe 2 leicht erhöhte mediane Werte. Ein signifikanter Unterschied wurde für alle fünf Assays in den Vergleichsgruppen inaktiv vs. milde aktiv (jeweils  $p<0,0001$  und PHA  $p=0,0148$ ) und inaktiv vs. aktiv (jeweils  $p<0,0001$ ) nachgewiesen. In der Vergleichsgruppe milde aktiv vs.

aktiv war der Unterschied lediglich bei DPC ( $p=0,0389$ ) und PHA ( $p=0,0401$ ) signifikant.

**Abb. 3.10:** Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen und SLE-Krankheitsaktivität

Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers dar. Der Interquartilabstand (25. bis 75. Perzentil) ist als Kasten eingezeichnet. Die mittlere Linie im Kasten repräsentiert den Median. Der obere und untere Strich ist bis zu den Extremwerten, die nicht weiter entfernt sind als das 1,5-fache des Interquartilabstandes, gezogen. Höhere Werte werden als einzelne Punkte eingetragen.

SLEDAI-2K: 0: inaktiv; 1: milde aktiv; 2: aktiv



Die Höhe der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen nahm im Median bei vier Assays (DPC, ORG, TBS und PHA) mit Zunahme der Krankheitsaktivität zu, wobei DPC den höchsten Anstieg der medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen bei aktivem SLE erreichte. EUR zeigte keine Veränderungen der Erhöhung der medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen.

<b>Tab. 3.8:</b> Relative Erhöhung des Anti-dsDNA-AK-Spiegels in Testpositiven in der Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität (eigene Darstellung)			
<b>Assay</b>	<b>SLE-Aktivität</b>	<b>Anzahl n</b>	<b>x-fache Erhöhung</b>
<b>DPC</b>	inaktiv	16	<b>2,6</b>
	milde aktiv	45	<b>3,7</b>
	aktiv	29	<b>6,8</b>
<b>ORG</b>	inaktiv	22	<b>1,9</b>
	milde aktiv	45	<b>5,2</b>
	aktiv	31	<b>5,6</b>
<b>TBS</b>	inaktiv	5	<b>1,8</b>
	milde aktiv	30	<b>3,1</b>
	aktiv	17	<b>3,1</b>
<b>EUR</b>	inaktiv	5	<b>2,4</b>
	milde aktiv	31	<b>2,7</b>
	aktiv	22	<b>2,1</b>
<b>PHA</b>	inaktiv	6	<b>2,0</b>
	milde aktiv	24	<b>2,5</b>
	aktiv	18	<b>3,4</b>

### 3.8.3 Anti-dsDNA-AK und Komplementfaktoren C3c, C4

Wir untersuchten im SLE-Kollektiv, wie die Komplementfaktoren C3c, C4 und die Anti-dsDNA-AK sich zu einander verhielten. Komplementfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE und sind ein etablierter Marker für die SLE-Krankheitsaktivität im Labor. Durch die Bildung von Immunkomplexen kommt es in vivo zum Komplementverbrauch.

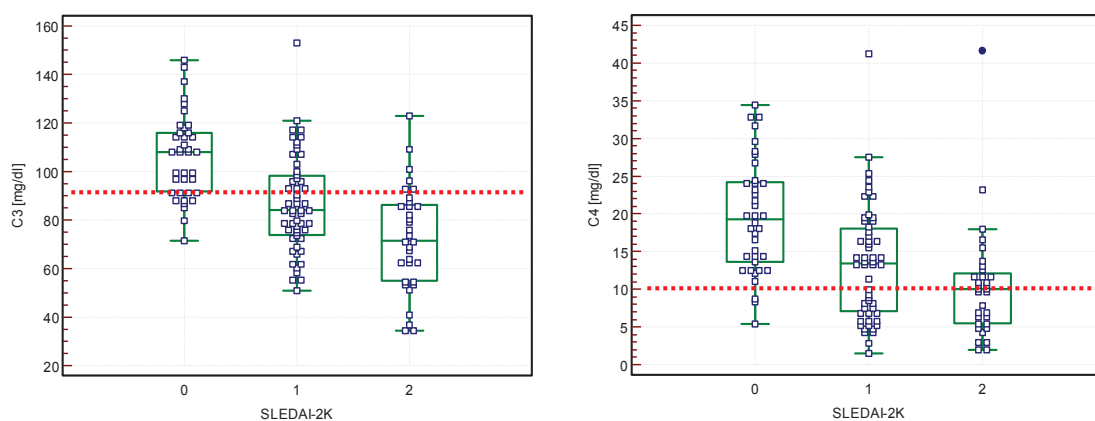
In der folgenden Abbildung sind C3c- und C4-Konzentrationen in Abhängigkeit von der SLE-Krankheitsaktivität aufgetragen. Mit Zunahme der Krankheitsaktivität nahmen die Konzentrationen von C3c und C4 deutlich ab. Die C3c-Konzentrationen erreichten in den drei Aktivitätsgruppen folgende Werte im Median 108 IU/ml, 84,2 IU/ml und 71,4 IU/ml. Damit unterschritten sie in der Aktivitätsgruppe 1 und 2 die untere Grenze des Referenzbereiches (90-

180 mg/dl). Es bestand ein signifikanter ( $p < 0,0001$ ) Unterschied in allen drei Vergleichsgruppen. Die mediane C4-Konzentration lag lediglich in der Aktivitätsgruppe 2 mit 10 mg/dl an der unteren Grenze des Referenzbereiches (10-40 mg/dl). Die Unterschiede waren lediglich in den Vergleichsgruppen inaktiv vs. milde aktiv und inaktiv vs. aktiv signifikant ( $p < 0,0001$ ).

**Abb. 3.11: C3c-, C4-Spiegel und SLEDAI-Krankheitsaktivität**

Die roten Linien stellen die untere Grenze des Referenzbereiches dar. Der Interquartilabstand (25. bis 75. Perzentil) ist als Kasten eingezeichnet. Die mittlere Linie im Kasten repräsentiert den Median. Der obere und untere Strich ist bis zu den Extremwerten, die nicht weiter entfernt sind als das 1,5-fache des Interquartilabstandes, gezogen. Höhere Werte werden als einzelne Punkte eingetragen.

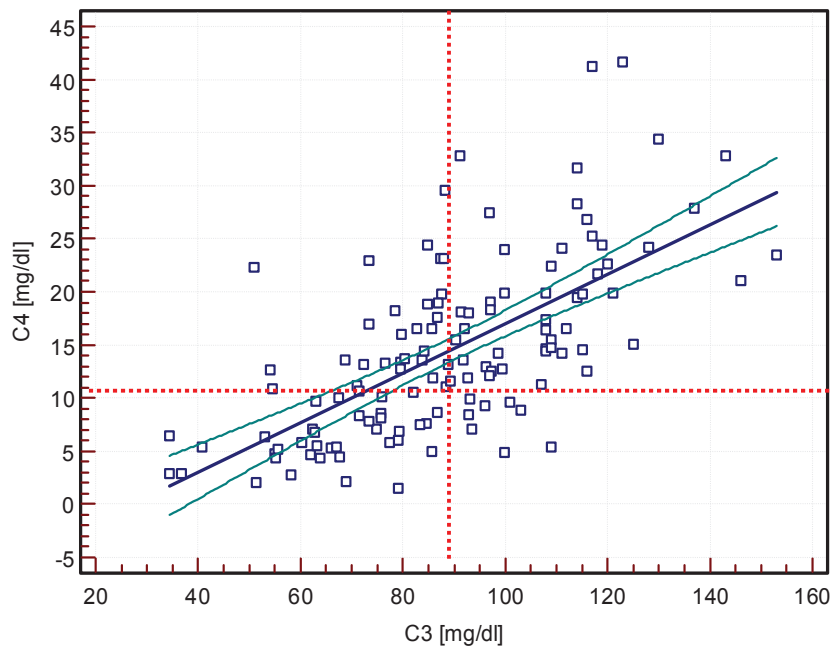
SLEDAI-2K: 0: inaktiv; 1: milde aktiv; 2: aktiv



Untereinander zeigten Komplementfaktoren C3c und C4 eine signifikant ( $p < 0,0001$ ) positive Korrelation.

### Abb. 3.12: Korrelation zwischen C3c und C4

Die roten Linien stellen die jeweilige untere Grenze des Referenzbereiches dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = 0,66$

CI (95%): 0,55 bis 0,75

Geradengleichung:  $y = -6,23 + 0,23x$

#### 3.8.3.1 Korrelation zwischen den Anti-dsDNA-AK und den Komplementfaktoren C3c und C4

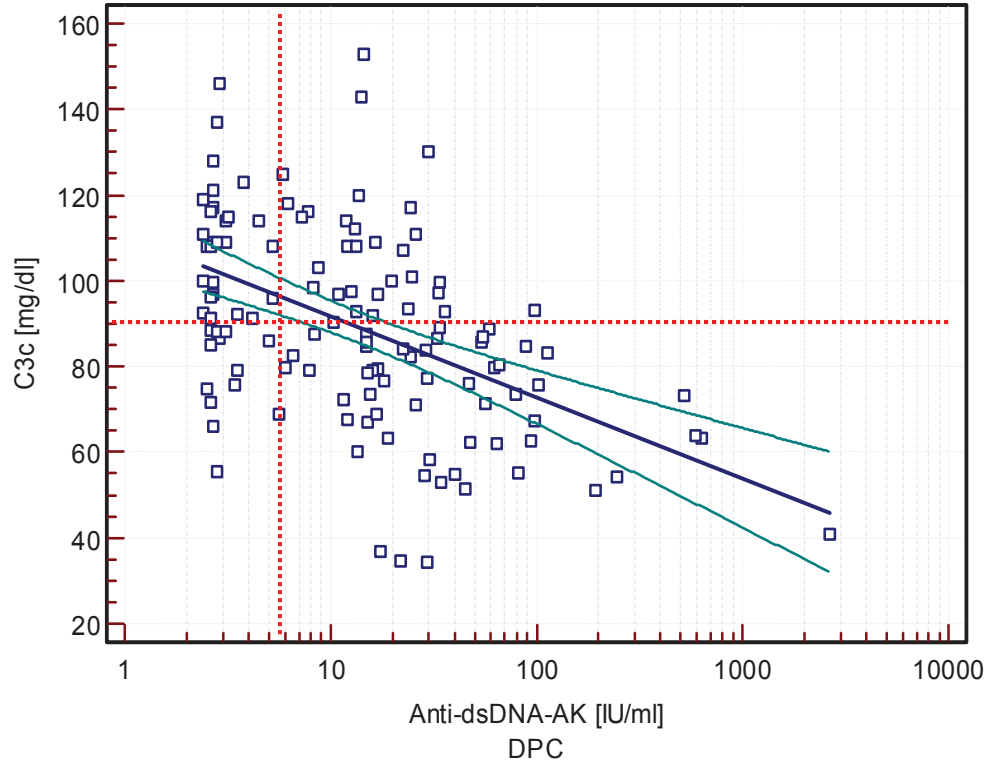
Zwischen den Komplementfaktoren C3c, C4 und den Anti-dsDNA-AK bestand eine signifikante negative Korrelation. Die Korrelation zwischen C3c und Anti-dsDNA-AK ( $-0,52 < r < -0,47$ ) war stärker, als diejenige zwischen C4 und den Anti-dsDNA-AK ( $-0,42 < r < -0,28$ ).

Die stärkste Korrelation zeigten Komplementfaktoren C3c mit Anti-dsDNA-AK, die mit dem Assay von ORG gemessen wurden, und Komplementfaktoren C4 mit Anti-dsDNA-AK, die mit dem Assay von EUR bestimmt wurden.

Es folgen beispielhafte Darstellungen der Korrelation zwischen den Komplementfaktoren C3c, C4 und den Anti-dsDNA-AK, die mit dem Assay von DPC gemessen wurden.

**Abb. 3.13:** Korrelation zwischen C3c und Anti-dsDNA-AK

Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers, bzw. die untere Grenze des Referenzbereiches dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = -0,49$

CI (95%): -0,61 bis -0,34

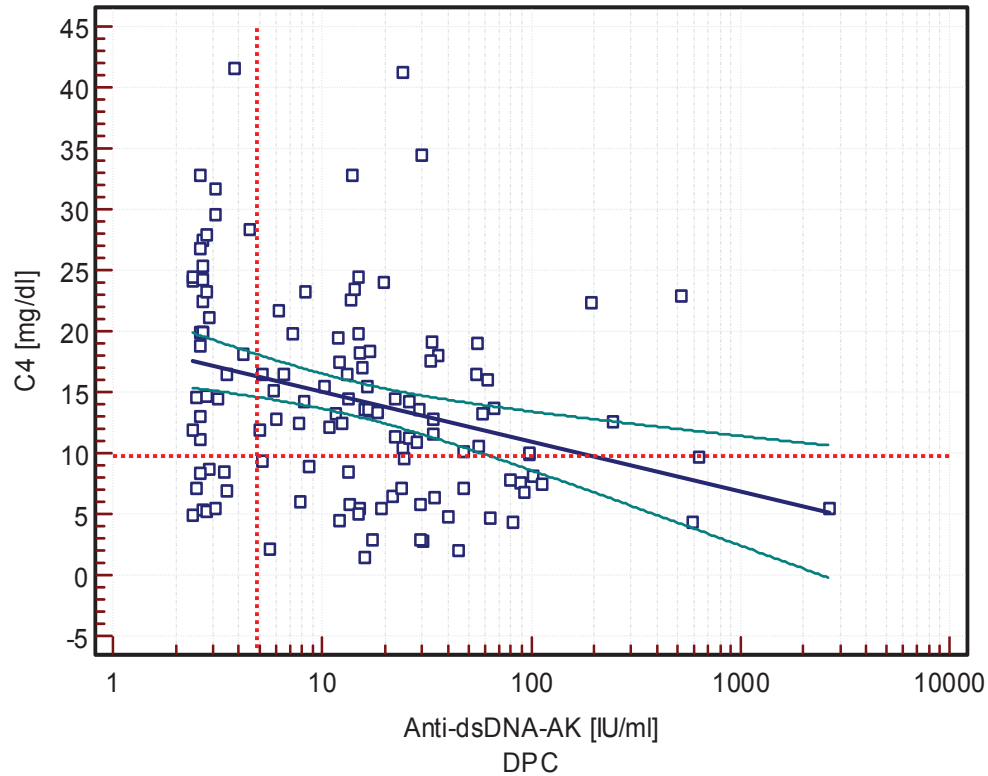
Geradengleichung  $y = 110,46 - 18,83 \log(x)$

**Tab. 3.9:** Korrelation zwischen C3c und Anti-dsDNA-AK  
(eigene Darstellung)

Assay	Korrelationskoeffizient r	Konfidenzintervall CI	p-Wert
DPC	-0,49	(-0,61 bis -0,34)	<0,0001
ORG	-0,52	(-0,63 bis -0,37)	<0,0001
TBS	-0,49	(-0,61 bis -0,35)	<0,0001
EUR	-0,5	(-0,62 bis -0,36)	<0,0001
PHA	-0,47	(-0,59 bis -0,32)	<0,0001

**Abb. 3.14:** Korrelation zwischen C4 und Anti-dsDNA-AK

Die roten Linien stellen den jeweiligen Cutoff-Wert des Herstellers, bzw. die untere Grenze des Referenzbereiches dar. Mit den grünen Linien ist das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden dargestellt.



$r = -0,3$       CI (95%): -0,45 bis -0,13      Geradengleichung  $y = 19,15 - 4,08 \log(x)$

<b>Tab. 3.10:</b> Korrelation zwischen C4 und Anti-dsDNA-AK (eigene Darstellung)			
Assay	Korrelationskoeffizient r	Konfidenzintervall CI	p-Wert
DPC	-0,3	(-0,45 bis -0,13)	0,0006
ORG	-0,36	(-0,50 bis -0,19)	<0,0001
TBS	-0,35	(-0,49 bis -0,19)	<0,0001
EUR	-0,42	(-0,56 bis -0,27)	<0,0001
PHA	-0,28	(-0,43 bis -0,11)	0,0019



### **3.9 Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der SLE-Therapie**

Die medikamentöse Immunsuppression bei Patienten mit SLE ist sehr vielfältig. In unserem SLE-Kollektiv wurden 20 verschiedene medikamentöse Schemata angewendet. Um der Frage nachzugehen, ob die medikamentöse Immunsuppression einen Einfluss auf die Anti-dsDNA-AK hat, wurden einzelne Therapie-Formen nach Medikamentenanzahl in vier große Gruppen (0: keine Medikamente, I: Mono-Therapie, II: Duo-Therapie und III: Trio-Therapie) zusammengefasst. Die Krankheitsdauer der SLE-Patienten in den vier Therapie-Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich und lag durchschnittlich zwischen 10,8 und 11,3 Jahren. Erwartungsgemäß nahm die Intensität der Therapie mit der Zunahme der SLE-Krankheitsaktivität zu (im Median: Gruppe 0: 4 Punkte; Gruppe I: 4 Punkte; Gruppe II: 5 Punkte und Gruppe III: 5,5 Punkte im SLEDAI-2K-Score).

In der folgenden Tabelle sind neben den Therapien die Patientenzahl, die Anzahl der positiven Anti-dsDNA-AK-Ergebnisse und die Prozentsätze für den jeweiligen Assay zusammengestellt.

Die Prävalenz der Anti-dsDNA-AK war bei ORG in allen vier Therapie-Gruppen am höchsten. Bei allen Assays stieg die Prävalenz in der Therapie-Gruppe III zwar an, das Signifikanzniveau wurde lediglich bei EUR mit  $p < 0,05$  im Vergleich zu den anderen Therapie-Gruppen erreicht.

**Tab. 3.11:** Anti-dsDNA-AK Prävalenz bei SLE-Patienten in Abhängigkeit der immunsuppressiven Therapie (eigene Darstellung)

Gruppe	Therapie-Form	Anzahl n	DPC		ORG		TBS		EUR		PHA	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>0</b>	<b>Keine Medikamente</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>60,9</b>	<b>19</b>	<b>82,6</b>	<b>7</b>	<b>30,4</b>	<b>8</b>	<b>34,8</b>	<b>10<sup>(1)</sup></b>	<b>45,5</b>
<b>I</b>	<b>Mono-Therapie</b>	<b>36</b>	<b>24</b>	<b>66,7</b>	<b>26</b>	<b>72,2</b>	<b>16</b>	<b>44,4</b>	<b>15</b>	<b>41,7</b>	<b>14</b>	<b>38,9</b>
1	Steroide	19	11		12		7		9		6	
2	AntiM	10	8		8		6		5		6	
3	AZA	5	5		4		1		0		1	
4	MTX	1	0		1		1		0		1	
5	CsA	1	0		1		1		1		0	
<b>II</b>	<b>Duo-Therapie</b>	<b>55</b>	<b>42</b>	<b>76,4</b>	<b>43<sup>(1)</sup></b>	<b>79,6</b>	<b>22</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>45,5</b>	<b>18</b>	<b>32,7</b>
6	Steroide+AntiM	23	18		19		9		10		9	
7	Steroide+AZA	11	7		7		3		4		2	
8	Steroide+MTX	5	4		4 <sup>(1)</sup>		2		3		2	
9	Steroide+CsA	2	2		1		0		0		0	
10	Steroide+MMF	7	7		7		5		5		4	
11	Steroide+CPh	2	1		2		1		1		1	
12	AntiM+AZA	1	1		1		1		1		0	
13	AntiM+MTX	3	1		1		0		0		0	
14	AntiM+MMF	1	1		1		1		1		0	
<b>III</b>	<b>Trio-Therapie</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>83,3</b>	<b>10</b>	<b>83,3</b>	<b>7</b>	<b>58,3</b>	<b>10</b>	<b>83,3</b>	<b>6</b>	<b>50</b>
15	Steroide+AntiM+AZA	7	6		6		5		6		4	
16	Steroide+AntiM+MTX	1	1		1		1		1		1	
17	Steroide+AntiM+CsA	1	1		1		0		1		0	
18	Steroide+AntiM+MMF	2	1		2		1		2		1	
19	Steroide+CsA+MMF	1	1		0		0		0		0	

<sup>(1)</sup> bei einem Patienten konnte mit dem entsprechenden Assay kein Messwert bestimmt werden.

Die medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen stiegen bei allen Assays in der Gruppe III deutlich über den jeweiligen vom Hersteller angegebenen Cutoff-Wert. Zwischen den Gruppen 0 bis II bestand kein Unterschied in den Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen. Das Signifikanzniveau wurde bei den Vergleichsgruppen 0 vs. III und I vs. III von DPC ( $p=0,0487$  und  $p=0,0474$ ) und EUR ( $p=0,0122$  und  $p=0,0225$ ) erreicht.

### **3.10 Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von der Nierenbeteiligung im SLE-Kollektiv**

Von allen Organbeteiligungen des SLE hat die Nierenbeteiligung, definiert als anhaltende Proteinurie von >0,5g täglich oder Zylindrurie, den gravierendsten Einfluss auf die Prognose. Die renale Zerstörung kann sowohl durch AK, die an zirkulierende Ag binden und somit zirkulierende Immunkomplex bilden, als auch durch AK, die an Ag, die in den glomerulären und vaskulären Membranen abgelagert sind, binden, entstehen.

Bei 33 Patienten lag eine Nierenbeteiligung vor. Die durchschnittliche Krankheitsdauer lag bei den Patienten mit Nierenbeteiligung bei 12,6 Jahren (von 0 bis 32 Jahre), bei den Patienten ohne Nierenbeteiligung bei 10,6 Jahren (von 1 bis 33 Jahre).

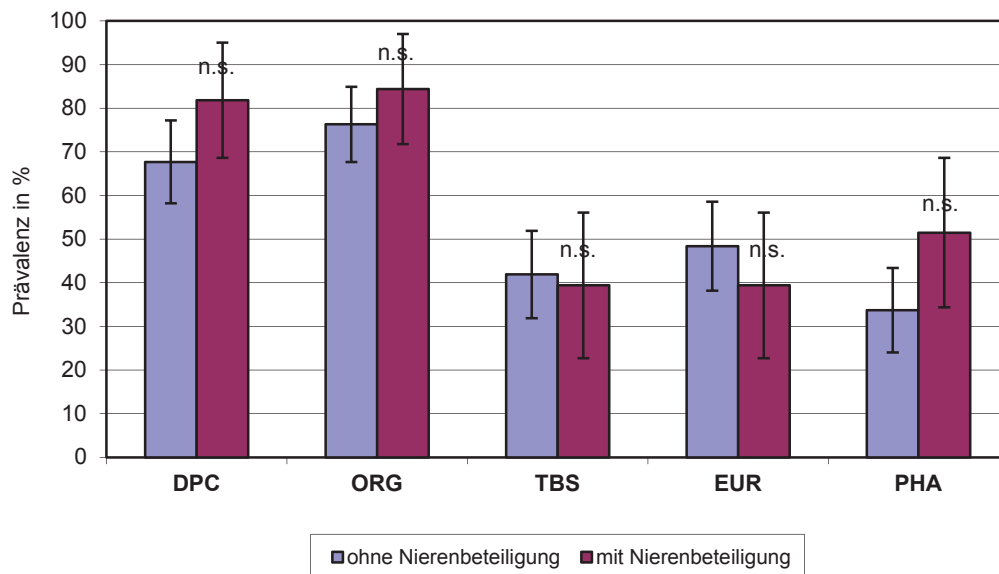
Im SLEDAI-2K-Score wurden in der Gruppe mit Nierenbeteiligung im Median 5 Punkte (2,5. Perzentil = 4 Punkte und 97,5. Perzentil = 25,4 Punkte) und in der Gruppe ohne Nierenbeteiligung im Median 4 Punkte (2,5. Perzentil = 4 Punkte und 97,5 Perzentil = 5 Punkte) erreicht.

Die medianen C3c-Werte lagen in beiden Gruppen unterhalb der unteren Grenze des Referenzbereiches (90-180 mg/dl). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den C3c- und C4-Werten in der Vergleichsgruppe mit vs. ohne Nierenbeteiligung (C3c-Werte im Median: „mit Nierenbeteiligung“: 85,7 mg/dl, „ohne Nierenbeteiligung“: 88,9 mg/dl; C4-Werte im Median: „mit Nierenbeteiligung“: 15,5 mg/dl, „ohne Nierenbeteiligung“: 12,8 mg/dl).

#### **3.10.1 Prävalenz und Konzentrationen von Anti-dsDNA-AK**

DPC und ORG erreichten erneut in beiden Gruppen die höchste Prävalenz (siehe Abb. 3.15). Beim Vergleich der Prävalenzen bei den Patienten mit Nierenbeteiligung und ohne Nierenbeteiligung wurden bei allen Assays keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen, jedoch zeigten die Assays DPC, ORG und PHA eine Tendenz zu einer höheren Anti-dsDNA-AK Prävalenz bei Patienten mit Nierenbeteiligung.

**Abb. 3.15:** Prävalenz von Anti-dsDNA-AK bezüglich der Nierenbeteiligung im SLE-Kollektiv



Signifikanz vs. ohne Nierenbeteiligung für jeden Assay: n.s.: nicht signifikant  
 [ 95% CI

Die medianen Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen waren sowohl bei den Patienten mit Nierenbeteiligung als auch ohne Nierenbeteiligung bei allen Assays nicht signifikant unterschiedlich. Dies galt in der Gesamtgruppe als auch in der Gruppe der Patienten, bei denen positive, d. h. erhöhte Werte, gemessen wurden.

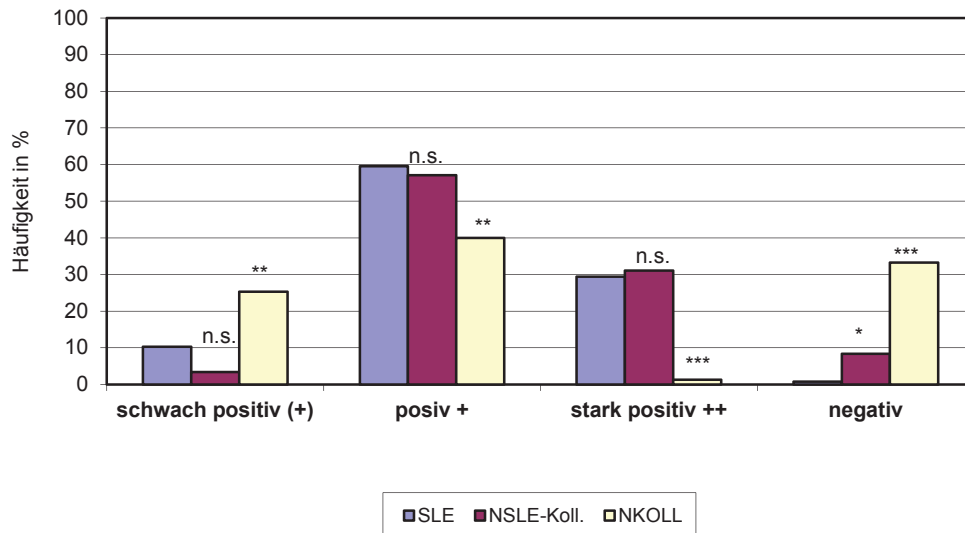
### 3.11 Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit von den ANA-Mustern

#### 3.11.1 IFT

Der IFT wurde bei insgesamt 395 Patienten durchgeführt (nicht durchgeführt bei 126 gesunden Kontrollen und 47 NKOLL-Patienten). Die Ergebnisse des IFT stellten sich in den drei untersuchten Kollektiven (SLE-Kollektiv mit 126 Patienten, NSLE-Koll.-Kollektiv mit 119 Patienten und NKOLL-Kollektiv mit 150 Patienten) wie folgt dar (siehe Abb. 3.16): schwach positive (+) und negative Ergebnisse kamen im NKOLL-Kollektiv signifikant häufiger vor als in den anderen beiden Kollektiven. Hingegen wurden positive + und stark positive ++ Ergebnisse signifikant häufiger in SLE- und NSLE-Koll.-Kollektiven gemessen.

Zwischen den SLE- und NSLE-Koll.-Kollektiven bestand lediglich bei den negativen Ergebnissen ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0107$ ).

**Abb. 3.16:** Darstellung der IFT-Ergebnisse in drei Studienkollektiven



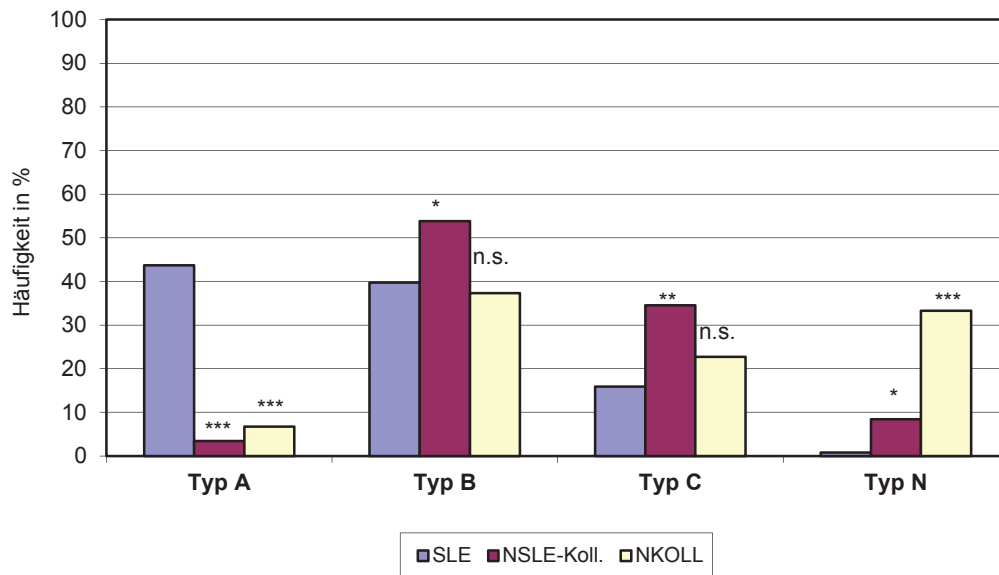
Signifikanz jeweils vs. SLE-Kollektiv: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,005$ ; \*\*\*  $p<0,0005$ ; n.s.: nicht signifikant

Neben der Intensität (Titerhöhe) werden beim IFT auch unterschiedliche Fluoreszenzmuster ausgewertet. Wir fassten die ANA-Muster zu vier Typen zusammen:

- Typ A: ANA-Muster „homogen chromosomen-positiv“
- Typ B: andere chromosomen-positive ANA-Muster
- Typ C: unterschiedliche chromosomen-negative ANA-Muster
- Typ N: negatives IFT-Ergebnis

Das Muster Typ A kam signifikant häufiger im SLE-Kollektiv vor. Die Muster Typ B und Typ C wurden signifikant häufiger im NSLE-Koll.-Kollektiv nachgewiesen. Negative Ergebnisse lagen signifikant häufiger im NKOLL-Kollektiv vor.

**Abb. 3.17:** Häufigkeit der ANA-Muster in drei Studienkollektiven



Signifikanz jeweils vs. SLE-Kollektiv: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; n.s.: nicht signifikant  
 Typ A: homogen chromosomen-positive ANA-Muster; Typ B: andere chromosomen-positive ANA-Muster;  
 Typ C: unterschiedliche chromosomen-negative ANA-Muster; Typ N: negatives IFT-Ergebnis.

Das Muster „homogen chromosomen-positiv“ trat, wie oben gezeigt, am häufigsten bei den SLE-Patienten auf. Im Hinblick auf den SLE war der IFT zwar hoch spezifisch, die diagnostische Sensitivität lag jedoch bei nur 43,7%. Weitere Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

<b>Tab. 3.12:</b> Diagnostische Sensitivität, Spezifität, Effizienz und prädiktive Werte in % für den IFT (eigene Darstellung)	
<b>diagnostische Sensitivität</b>	43,7
<b>diagnostische Spezifität</b>	94,8
<b>diagnostische Effizienz</b>	78,5
<b>positiv prädiktiver Wert</b>	79,7
<b>negativ prädiktiver Wert</b>	78,2

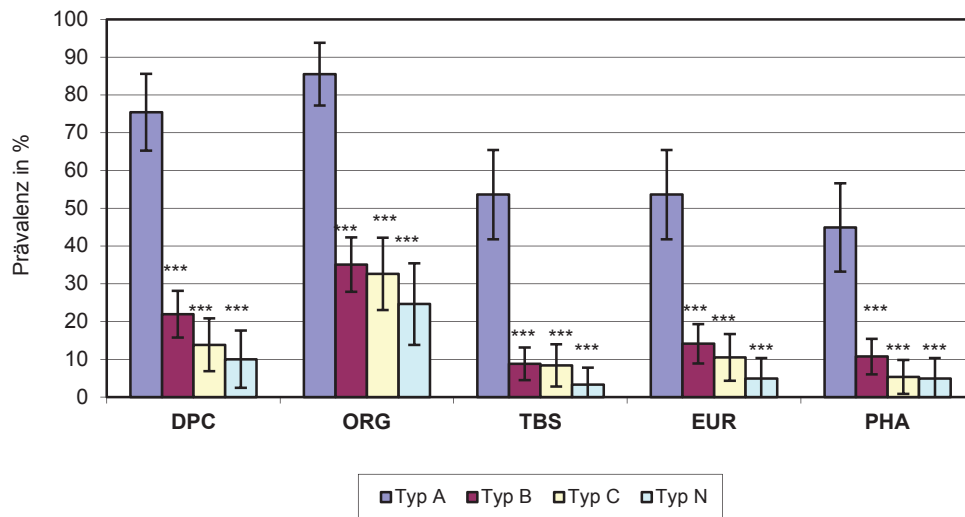
### 3.11.2 Prävalenz von Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit vom ANA-Muster

Im Weiteren gingen wir der Frage nach, ob Anti-dsDNA-AK mit bestimmten ANA-Mustern assoziiert sind.

Die Prävalenz von Anti-dsDNA-AK war beim Vorliegen des Musters Typ A bei allen Assays signifikant höher als beim Vorliegen anderer Muster. DPC und

ORG zeigten erneut signifikant höhere Prävalenzen als die anderen drei Assays.

**Abb. 3.18:** Prävalenz von Anti-dsDNA-AK in Abhängigkeit vom ANA-Muster bei allen IFT-getesteten Patienten



Signifikanz vs. Typ A für jeden Assay: \*\*\*  $p < 0,0005$   
 [ 95% CI

### 3.11.3 Kombination von Anti-dsDNA-AK-Assays und IFT

Das Muster „homogen chromosomen-positiv“ wies eine hohe Assoziation mit den Anti-dsDNA-AK und deshalb untersuchten wir im Weiteren, ob die Diagnostik von der Kombination zweier unterschiedlicher Verfahren (IFT plus ein Anti-dsDNA-AK-Assay) profitiert. Alle Werte wurden für den Vergleich SLE vs. alle Nicht-SLE-Kranke ermittelt. In der folgenden Tabelle sind die Begriffe, die zur weiteren Berechnung benutzt wurden, definiert.

<b>Tab. 3.13:</b> Erläuterung der Begriffe (eigene Darstellung)	
<b>richtig positiv</b>	SLE-Patienten, die das Doppelkriterium (hom+ und Anti-dsDNA-AK positiv) erfüllen
<b>falsch positiv</b>	Nicht-SLE-Kranke, die das Doppelkriterium (hom+ und Anti-dsDNA-AK positiv) erfüllen
<b>richtig negativ</b>	Nicht-SLE-Kranke, die das Doppelkriterium <b>nicht</b> erfüllen (d. h. Anti-dsDNA-AK positiv aber nicht hom+ ODER hom+ aber nicht Anti-dsDNA-AK positiv ODER nicht hom+ und nicht Anti-dsDNA-AK positiv)
<b>falsch negativ</b>	SLE-Patienten, die das Doppelkriterium <b>nicht</b> erfüllen (d. h. Anti-dsDNA-AK positiv aber nicht hom+ ODER hom+ aber nicht Anti-dsDNA-AK positiv ODER nicht hom+ und nicht Anti-dsDNA-AK positiv)

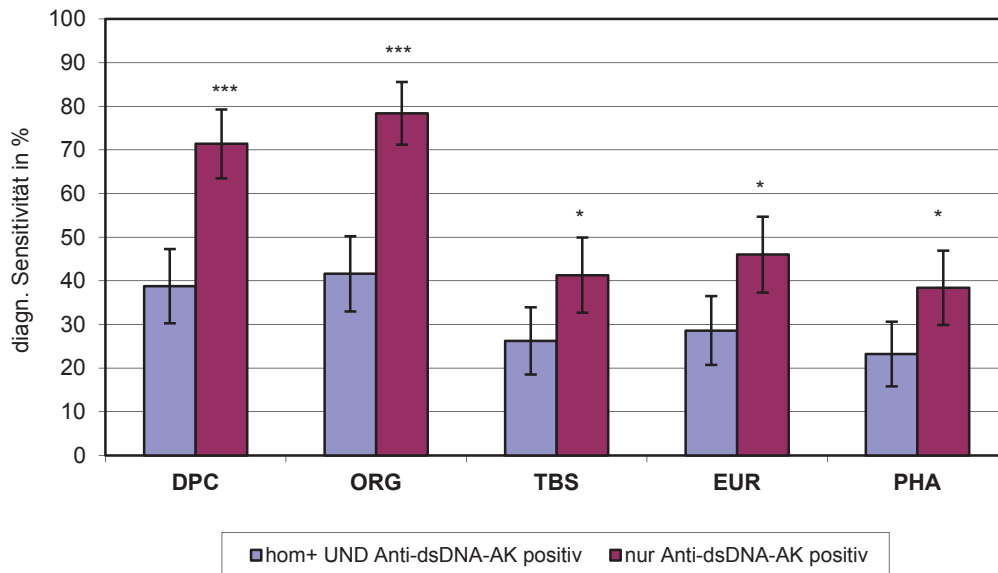
Die Doppeluntersuchung (IFT plus ein Anti-dsDNA-AK-Assay) wurde bei insgesamt 395 Patienten durchgeführt. Da bei einigen Patienten aufgrund von zu wenig Material bei DPC, ORG und PHA kein Messwert bestimmt werden konnte (siehe Tabelle 3.1), wurden die Berechnungen mit korrigierten Zahlen durchgeführt.

#### 3.11.3.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die diagnostische Sensitivität für SLE nahm bei der Kombination des IFT mit einem Anti-dsDNA-AK-Assay im Vergleich zu der alleinigen Messung mit einem Anti-dsDNA-AK-Assay bei allen Assays signifikant ab (siehe Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die diagnostische Spezifität bei dieser Testkombination bei allen Assays, wobei das Signifikanzniveau lediglich bei DPC, ORG und EUR erreicht wurde (siehe Abb. 3.20). Für den Assay ORG wurde bei Anwendung des Doppelkriteriums eine den anderen Assays vergleichbare Spezifität erreicht.

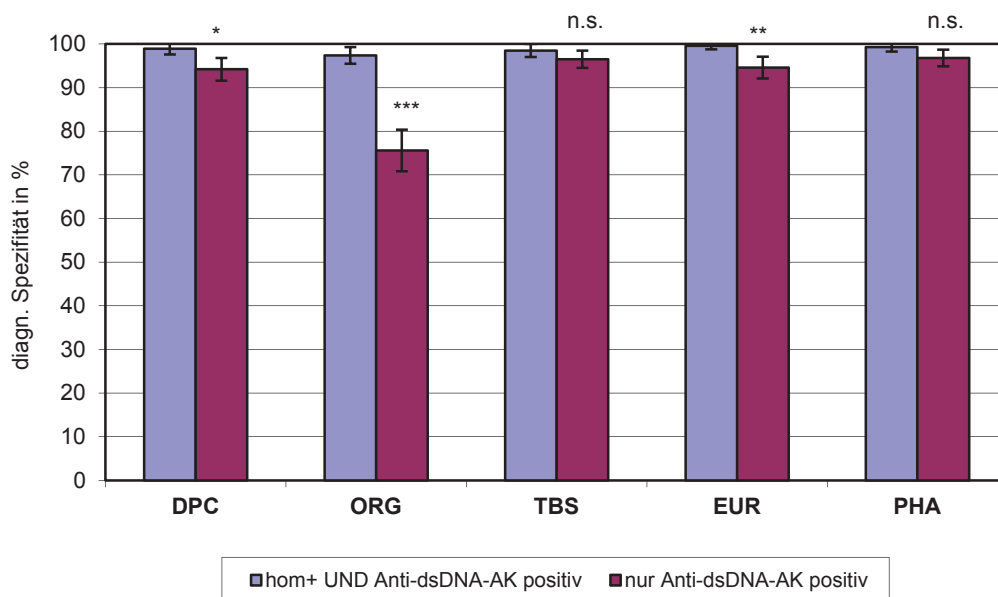


**Abb. 3.19:** Diagnostische Sensitivität für die Diagnose SLE beim Vorliegen des ANA-Musters „homogen chromosomen-positiv“ und gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität



Signifikanz vs. „hom+ UND Anti-dsDNA-AK positiv“ für jeden Assay: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$   
 [ 95% CI

**Abb. 3.20:** Diagnostische Spezifität für die Diagnose SLE beim Vorliegen des ANA-Musters „homogen chromosomen-positiv“ und gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität

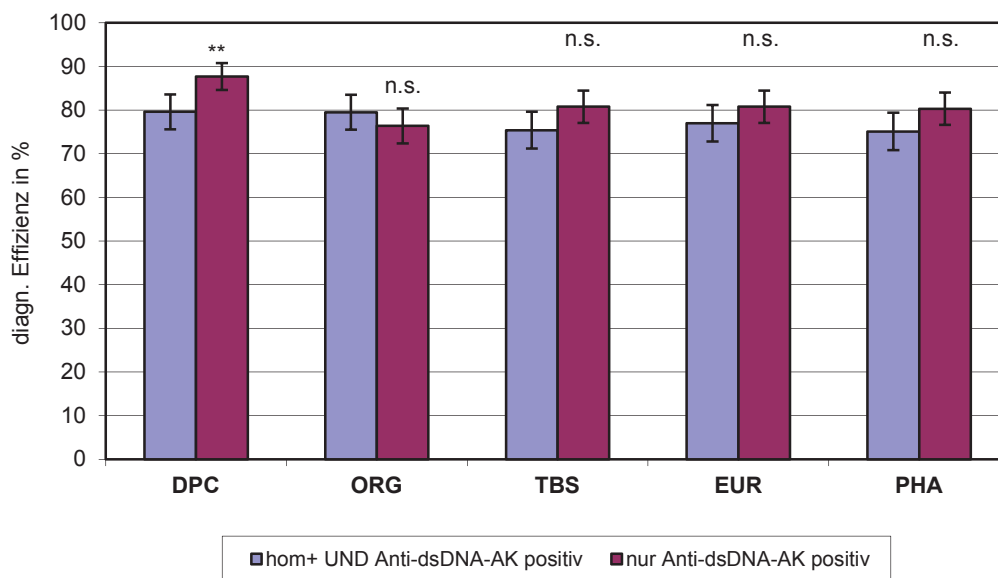


Signifikanz vs. „hom+ UND Anti-dsDNA-AK positiv“ für jeden Assay: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ;  
 n.s.: nicht signifikant  
 [ 95% CI

### 3.11.3.2 Diagnostische Effizienz

Bei DPC nahm die diagnostische Effizienz für SLE bei der Anwendung des Doppelkriteriums signifikant ab. Die Veränderungen der diagnostischen Effizienz waren bei den anderen vier Assays (ORG, TBS, EUR und PHA) hingegen nicht signifikant.

**Abb. 3.21:** Diagnostische Effizienz für die Diagnose SLE beim Vorliegen des ANA-Musters „homogen chromosomen positiv“ und gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität

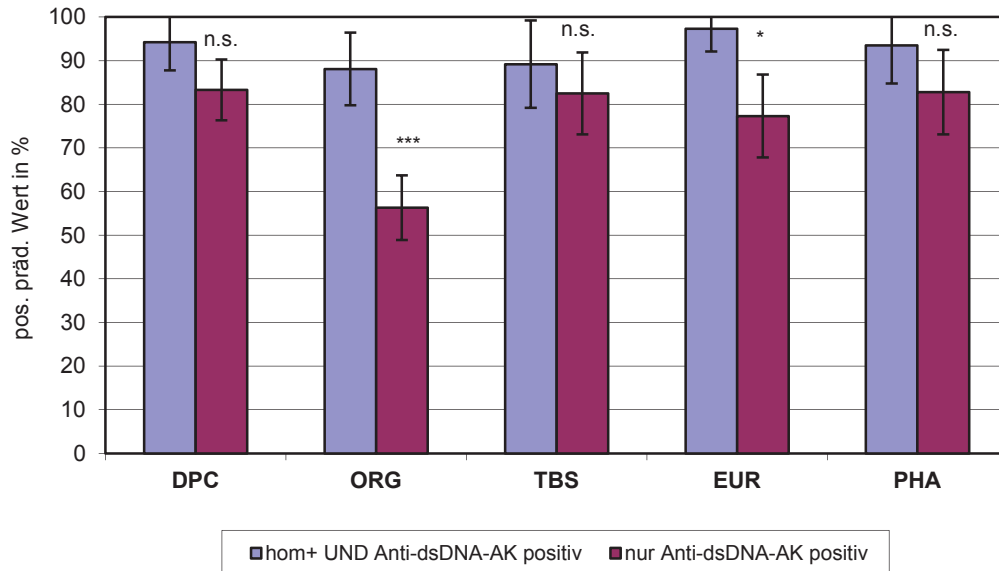


Signifikanz vs. „hom+ UND Anti-dsDNA-AK positiv“ für jeden Assay: \*\*  $p < 0,005$ ; n.s.: nicht signifikant  
[ 95% CI

### 3.11.3.3 Prädiktive Werte

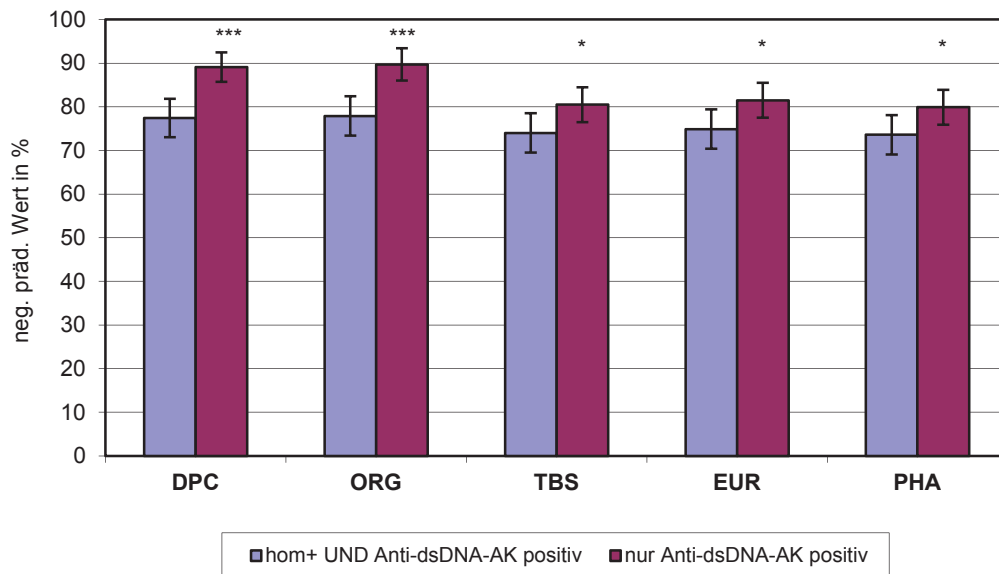
Bei allen fünf Assays erhöhte sich bei der Anwendung des Doppelkriteriums der positiv prädiktive Wert auf über 85% (siehe Abb. 3.22). Das Signifikanzniveau wurde jedoch nur bei ORG und EUR erreicht. Die negativ prädiktiven Werte nahmen bei allen Assays signifikant ab (siehe Abb. 3.23).

**Abb. 3.22:** Positiv prädiktiver Wert für die Diagnose SLE beim Vorliegen des ANA-Musters „homogen chromosomen-positiv“ UND gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität



Signifikanz vs. „hom+ UND Anti-dsDNA-AK positiv“ für jeden Assay: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; n.s.: nicht signifikant  
 [ 95% CI

**Abb. 3.23:** Negativ prädiktiver Wert für die Diagnose SLE bei Fehlen des Doppelkriteriums „ANA homogen chromosomen-positiv“ UND gleichzeitiger Anti-dsDNA-AK-Positivität

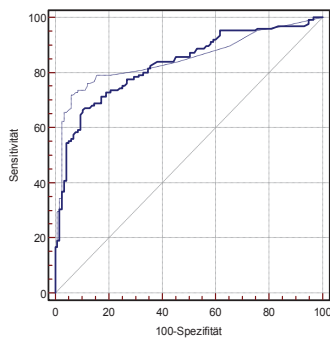


Signifikanz vs. „hom+ UND Anti-dsDNA-AK positiv“ für jeden Assay: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$   
 [ 95% CI

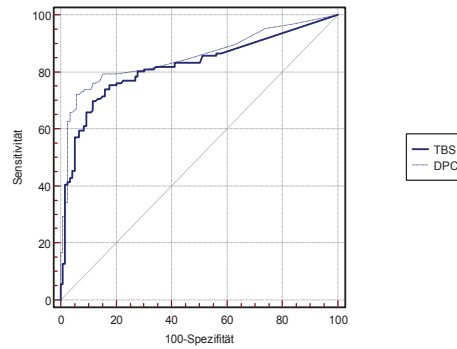
### 3.12 ROC-Kurvenanalyse

Um zu prüfen, ob die Cutoff-Werte der Hersteller geeignet sind, zwischen SLE und dem wichtigsten differentialdiagnostischen Kollektiv, den NSLE-Kollagenosen, zu differenzieren, führten wir eine ROC-Kurvenanalyse durch. Die Fläche unter der Kurve (AUC) war bei DPC mit  $AUC=0,852$  am größten und bei EUR mit  $AUC=0,779$  am kleinsten. Der Unterschied zwischen den AUC's von EUR und DPC war statistisch signifikant ( $p = 0,016$ ). Die AUC des Assays PHA war darüber hinaus tendenziell kleiner als die des Bezugsassays DPC ( $p = 0,094$ ).

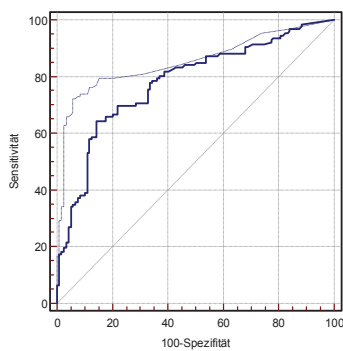
**Abb. 3.24:** Vergleich zwischen SLE und NSLE-Kollagenosen



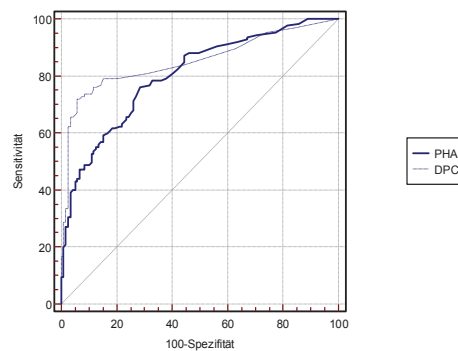
AUC (ORG) = 0,830 95%-CI 0,776 bis 0,875  
 AUC (DPC) = 0,847 95%-CI 0,795 bis 0,890  
 $p=0,494$  für die AUC-Differenz



AUC (TBS) = 0,819 95%-CI 0,765 bis 0,865  
 AUC (DPC) = 0,852 95%-CI 0,801 bis 0,894  
 $p=0,198$  für die AUC-Differenz



AUC (EUR) = 0,779 95%-CI 0,722 bis 0,830  
 AUC (DPC) = 0,852 95%-CI 0,801 bis 0,894  
 $p=0,016$  für die AUC-Differenz



AUC (PHA)=0,803 95%-CI 0,747 bis 0,851  
 AUC (DPC)=0,851 95%-CI 0,800 bis 0,893  
 $p=0,094$  für die AUC-Differenz

### **3.12.1 Optimierung der Cutoff-Werte**

Mit der ROC-Kurvenanalyse ist es möglich, den Cutoff-Wert mit optimierter diagnostischer Effizienz zu ermitteln. Klinisch ist es häufig relevanter, einen Test mit hoher diagnostischer Spezifität zu haben, so dass auch die Cutoff-Werte bei vorgegebener diagnostischer Spezifität von 95% ermittelt wurden.

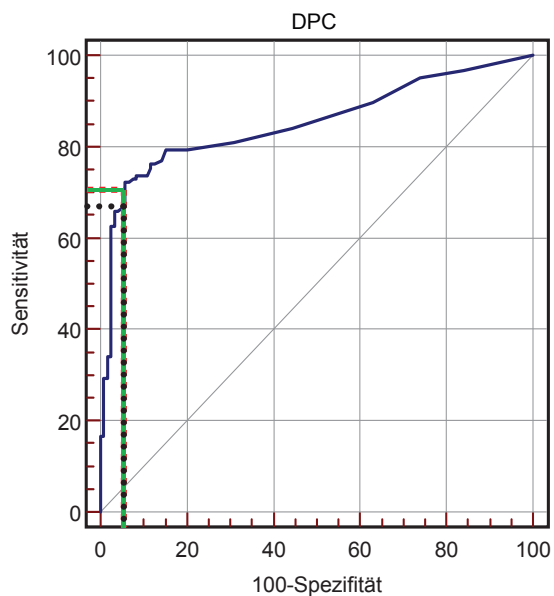
### 3.12.1.1 ROC-Analyse für DPC

Nach der ROC-Kurvenanalyse betrug der optimierte Cutoff-Wert für DPC 4,3 IU/ml und unterschied sich damit nur unwesentlich von dem Cutoff-Wert des Herstellers von 5 IU/ml. Die diagnostische Effizienz veränderte sich nicht. Eine 95%-ige diagnostische Spezifität konnte bei einem Cutoff-Wert von 6 IU/ml erreicht werden. Die diagnostische Sensitivität nahm jedoch geringfügig ab.

<b>Tab. 3.14: ROC-Analyse für DPC</b> (eigene Darstellung)				
Cutoff	Cutoff-Wert [IU/ml]	Sensitivität in %	Spezifität in %	Effizienz in %
nach Hersteller	5	71,4	94,1	82,4
nach ROC optimiert	4,3	72,2	93,3	82,4
95%-Spezifität	6	67,5	95	80,3

**Abb. 3.25: Cutoff-Werte für DPC**

Die rote Linie stellt den Cutoff-Wert des Herstellers, die grüne Linie – den optimierten Cutoff-Wert und die schwarze Linie - den Cutoff-Wert bei vorgegebener 95%-iger Spezifität da.



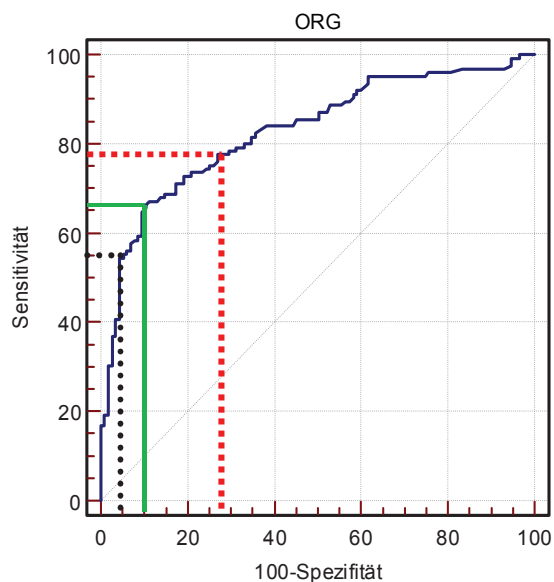
### 3.12.1.2 ROC-Analyse für ORG

Der Assay ORG zeichnete sich beim Cutoff-Wert des Herstellers von 20 IU/ml durch eine hohe diagnostische Sensitivität und eine niedrigere diagnostische Spezifität aus. Der optimierte Cutoff-Wert lag bei 30,5 IU/ml und die diagnostische Spezifität verbesserte sich dadurch signifikant. Um eine 95%-ige diagnostische Spezifität zu erreichen, musste der Cutoff-Wert des Herstellers mehr als verdoppelt werden. Es kam erwartungsgemäß zu einer weiteren Abnahme der diagnostischen Sensitivität, wobei sich die diagnostische Effizienz nur unwesentlich verändert hat.

Tab. 3.15: ROC-Analyse für ORG (eigene Darstellung)				
Cutoff	Cutoff-Wert [IU/ml]	Sensitivität in %	Spezifität in %	Effizienz in %
nach Hersteller	20	78,4	70,4	74,6
nach ROC optimiert	30,5	66,4	89,6	77,5
95%-Spezifität	47	54,4	95	73,8

Abb. 3.26: Cutoff-Werte für ORG

Die rote Linie stellt den Cutoff-Wert des Herstellers, die grüne Linie – den optimierten Cutoff-Wert und die schwarze Linie - den Cutoff-Wert bei vorgegebener 95%-iger Spezifität da.



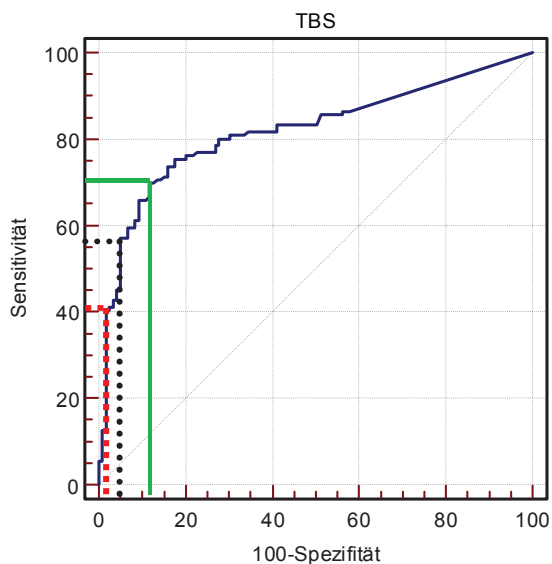
### 3.12.1.3 ROC-Analyse für TBS

Bei TBS lag der optimierte Cutoff-Wert um 48,5 IU/ml niedriger, als der vom Hersteller angegebene Cutoff-Wert von 75 IU/ml. Bei einem optimierten Cutoff-Wert von 26,5 IU/ml konnte die diagnostische Sensitivität um 28,5% auf 69,8% und die diagnostische Effizienz um 10,2% auf 78,4% signifikant erhöht werden. Selbst bei einer 95%-igen Spezifität ist der Cutoff-Wert mit 39,4 IU/ml deutlich unter dem von Hersteller angegebenen Cutoff-Wert. Die diagnostische Sensitivität nahm signifikant auf 57,1% zu.

Tab. 3.16: ROC-Analyse für TBS (eigene Darstellung)				
Cutoff	Cutoff-Wert [IU/ml]	Sensitivität in %	Spezifität in %	Effizienz in %
nach Hersteller	75	41,3	96,6	68,2
nach ROC optimiert	26,4	69,8	87,4	78,4
95%-Spezifität	39,4	57,1	95	75,1

Abb. 3.27: Cutoff-Werte für TBS

Die rote Linie stellt den Cutoff-Wert des Herstellers, die grüne Linie – den optimierten Cutoff-Wert und die schwarze Linie - den Cutoff-Wert bei vorgegebener 95%-iger Spezifität da.





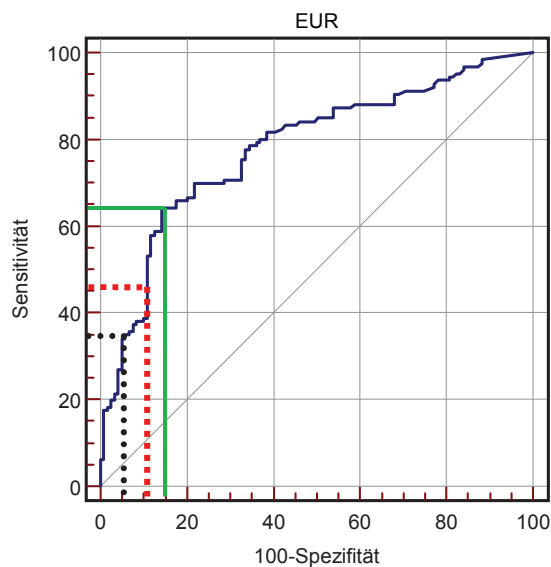
### 3.12.1.4 ROC-Analyse für EUR

Der optimierte Cutoff-Wert für EUR betrug 54,9 IU/ml. Auf diese Weise konnte die diagnostische Sensitivität von 46% auf 64,3% signifikant gesteigert werden und die diagnostische Spezifität nahm nur gering ab. Um eine diagnostische Spezifität von 95% zu erreichen, musste der Cutoff-Wert auf 174,7 IU/ml stark erhöht werden. Hierbei fielen sowohl die diagnostische Sensitivität (34,1%) als auch die diagnostische Effizienz (63,3%) auf verhältnismäßig niedrige Werte ab.

Tab. 3.17: ROC-Analyse für EUR (eigene Darstellung)				
Cutoff	Cutoff-Wert [IU/ml]	Sensitivität in %	Spezifität in %	Effizienz in %
nach Hersteller	100	46	89,1	67
nach ROC optimiert	54,9	64,3	85,7	74,7
95%-Spezifität	174,7	34,1	95	63,3

Abb. 3.28: Cutoff-Werte für EUR

Die rote Linie stellt den Cutoff-Wert des Herstellers, die grüne Linie – den optimierten Cutoff-Wert und die schwarze Linie - den Cutoff-Wert bei vorgegebener 95%-iger Spezifität da.



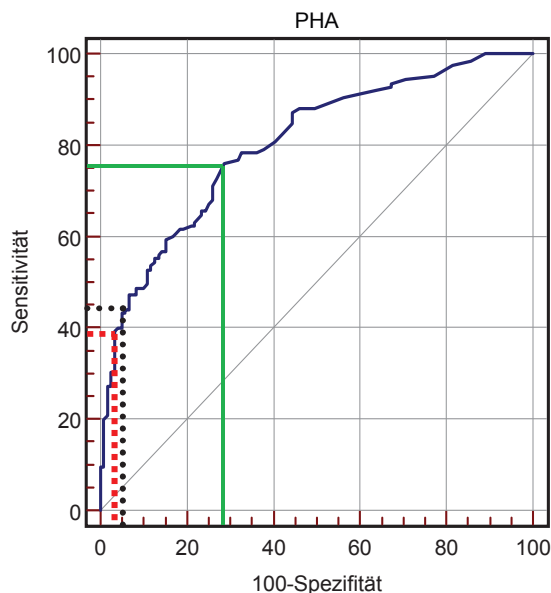
### 3.12.1.5 ROC-Analyse für PHA

Bei PHA musste der Cutoff-Wert von 15 IU/ml auf 2 IU/ml gesenkt werden, um die höchste diagnostische Effizienz von 72,5% zu erreichen. Bei diesem optimierten Cutoff-Wert zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme der diagnostischen Spezifität von 96,6% auf 68,1%. Beim Cutoff-Wert von 11,8 IU/ml wurde eine diagnostische Spezifität von 95% erreicht, wobei die Veränderung der diagnostischen Effizienz gegenüber dem Hersteller Cutoff nur marginal war.

Tab. 3.18: ROC-Analyse für PHA (eigene Darstellung)				
Cutoff	Cutoff-Wert [IU/ml]	Sensitivität in %	Spezifität in %	Effizienz in %
nach Hersteller	15	38,4	96,6	66,8
nach ROC optimiert	2	76,8	68,1	72,5
95%-Spezifität	11,8	43,2	95	68

**Abb. 3.29:** Cutoff-Werte für PHA

Die rote Linie stellt den Cutoff-Wert des Herstellers, die grüne Linie – den optimierten Cutoff-Wert und die schwarze Linie - den Cutoff-Wert bei vorgegebener 95%-iger Spezifität da.



### **3.12.2 Zusammenfassung der ROC-Analyse**

Abgesehen von DPC, bei dem der vom Hersteller vorgegebene Cutoff-Wert nur unwesentlich vom optimierten Cutoff-Wert abwich, mussten bei den anderen vier Assays die Cutoff-Werte stark angepasst werden, um eine optimale diagnostische Effizienz zu erzielen. Im Weiteren gab es den Assay von ORG, der eine schlechte diagnostische Spezifität aufwies. Durch eine Erhöhung des Cutoff-Wertes um 50% konnte die diagnostische Spezifität signifikant gesteigert werden. TBS und PHA waren vom Hersteller aus auf Spezifität angelegt und wiesen dem entsprechend eine geringe diagnostische Sensitivität auf. Bei EUR konnte durch eine Halbierung des Cutoff-Wertes die diagnostische Sensitivität signifikant gesteigert und die diagnostische Spezifität nur gering verändert werden.

## 4. Diskussion

Der SLE gehört zur Gruppe der Kollagenosen und zeichnet sich durch eine Vielfalt unterschiedlicher klinischer und serologischer Merkmale aus, die zu differentialdiagnostischen Schwierigkeiten führen können. Die wichtigsten serologischen Marker sind die ANA und vor allem die Anti-dsDNA-AK. ANA sind zwar nicht spezifisch für SLE, da sie bei vielen anderen autoimmunologischen, rheumatischen und infektiösen Erkrankungen vorkommen, werden jedoch bei bis zu 98% der SLE-Patienten nachgewiesen (Mills JA 1994, Sawalha AH et al. 2004). Mehrere Studien belegen, dass spezifische extrahierbare nukleäre AK mit unterschiedlichen SLE-Symptomen assoziiert sind. Zum Beispiel werden Anti-dsDNA-AK gehäuft bei Patienten mit einer Lupusnephritis oder Anti-SSA-/Anti-SSB-AK bei Patienten mit Siccasymptomatik nachgewiesen. (Sulcebe G et al. 1992, Thompson D et al. 1993, Valchoyiannopoulos PG et al. 1993).

Die Diagnose eines SLE kann bei Vorliegen von mindestens vier von elf ACR-Kriterien geäußert werden (Tan EM et al. 1982). Da sich zwei der elf ACR-Kriterien für die Klassifikation eines SLE auf den Nachweis von ANA und von SLE-typischen AK wie zum Beispiel Anti-dsDNA-AK und anti-Sm-AK beziehen, ist die genaue Typisierung des AK-Musters außerordentlich wichtig. Mit dem Vorhandensein eines positiven Titers für ANA und zusätzlicher Positivität für die Anti-dsDNA-AK sind bereits zwei der vier nötigen Bedingungen für die Klassifikation eines SLE erfüllt. Von diagnostischer Relevanz sind insbesondere die Anti-dsDNA-AK mit hoher Affinität und vom Isotyp IgG, da sie jeweils eine hohe Spezifität für SLE besitzen (Smeenk R et al. 1990, Winkler TH et al. 1994, Egner W 2000).

Als Screening-Untersuchung für ANA wird in der Regel zunächst der IFT an HEp-2 Zellen als Substrat durchgeführt. Anti-dsDNA-AK werden mittels verschiedener Testsysteme in unterschiedlichem Ausmaß erfasst. Dazu zählen der ELISA, der RIA, der FIA und der Immunfluoreszenztest mit *Criethidia luciliae* als Substrat (CLIFT), welcher allerdings in dieser Studie nicht untersucht wurde.

In dieser Arbeit werden drei erstgenannte Testsysteme zur Bestimmung der Anti-dsDNA-AK hinsichtlich ihrer diagnostischen Sensitivität, Spezifität, Effizienz und der prädiktiven Werte miteinander verglichen. Untersucht wurden ein Farr-RIA mit einem Assay von DPC Biermann® (DPC), drei ELISA mit jeweils einem Assay von ORGenTec® (ORG), The Binding Site® (TBS) und Euroimmun® (EUR), sowie ein automatisierter FIA mit einem Assay von Pharmacia® (PHA). Des Weiteren wird auf die Beziehung zwischen Anti-dsDNA-AK und SLE-Krankheitsaktivität, Komplementverbrauch, medikamentöse SLE-Therapie, Nierenbeteiligung bei SLE-Patienten und ANA-Muster im IFT eingegangen.

Im Vergleich der drei unterschiedlichen Methoden zeigte sich, dass die höchste diagnostische Sensitivität für den Nachweis von Anti-dsDNA-AK von dem ELISA von ORG (78,4%) und dem Farr-RIA von DPC (71,4%) erreicht wurde. Die diagnostische Sensitivität der anderen drei Assays war signifikant niedriger (38,4% bis 46%,  $p < 0,0005$ ). Die diagnostische Spezifität war hingegen bei dem ELISA von ORG signifikant geringer als bei den anderen vier Assays (80,6% vs. 95,9% bis 97,5%,  $p < 0,0005$ ). Das Ergebnis, dass der ELISA durch eine hohe Sensitivität und eine etwas schlechtere Spezifität gekennzeichnet ist, findet sich in zahlreichen anderen Untersuchungen wieder (Tzioufas AG et al. 1990, Wigand R et al. 1996, Wigand R et al. 1997, Tan EM et al. 1988, Smeenk RJT et al. 1991, Villalta D et al. 2003, Salonen EM et al. 2004, Egner W 2000). Die hier gefundene Konstellation aus geringer diagnostischer Spezifität und gleichzeitig hoher diagnostischer Sensitivität weist darauf hin, dass Anti-dsDNA-AK niedriger Affinität miterfasst werden. Diese AK finden sich bereits in der Frühphase eines SLE, was die höhere diagnostische Sensitivität erklärt, können aber auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen nachweisbar sein, wodurch sich die geringe diagnostische Spezifität ergibt. Von den drei ELISA-Testsystemen ist lediglich ORG durch eine hohe diagnostische Sensitivität und eine geringere diagnostische Spezifität gekennzeichnet, was darauf zurückschließen lässt, dass er hochempfindlich sowohl nieder- als auch hochaffine Anti-dsDNA-AK erfasst (Werle E et al. 1992).

Mit dem ELISA von ORG wurden bei 85 von 442 Probanden, die nicht an SLE litten, darunter auch bei neun gesunden Probanden, falsch-positive Ergebnisse gemessen. Auch andere Autoren zeigten, dass niedrige Konzentrationen vor allem der niederaffinen Anti-dsDNA-AK der IgG-Klasse bei gesunden Menschen nachgewiesen werden können. Beim SLE kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Synthese von hochaffinen Anti-dsDNA-AK durch B-Lymphozyten. Die Synthese von Anti-ssDNA-AK sowie von niederaffine Anti-dsDNA-AK ist hingegen weniger spezifisch für den SLE und kann mitunter bei gesunden, v.a. älteren Menschen auftreten, oder bei Patienten, die an unterschiedlichen Krankheiten leiden (z.B. Infektionen, Autoimmunhepatitiden), beobachtet werden (Villalta et al. 2003). Diese genaue Funktion der Anti-ssDNA-AK bei der SLE-Pathogenese ist unklar. (Nossent JC et al. 1989, Ruffatti A et al. 1990, Kadlubowski M et al. 1991, Smeenk RJT et al 1991, Tan EM et al. 1997, Makowski GS et al. 2003, Rekvig OP et al. 2003, Bobeck MJ et al. 2007). Bei den vom ELISA von ORG nachgewiesenen AK handelt es sich somit am ehesten auch um Anti-ssDNA-AK und um niedrigtitrige niederaffine Anti-dsDNA-AK. Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dsDNA-Ag kann es durch die Veränderung der DNA-Moleküle zur Freisetzung der Bindungsstellen für Anti-dsDNA-AK kommen (Villalta D et al. 2002). Die hohe Anzahl der falsch positiven Ergebnisse spiegelt sich bei ELISA von ORG in dem signifikant niedrigerem positiv prädiktivem Wert wider (53,6% vs. 77,3% bis 83,3%,  $p < 0,005$ ). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein SLE bei einem positiven Ergebnis vorliegt, ist bei ELISA von ORG somit am geringsten.

Die ELISA von TBS und EUR weisen Anti-dsDNA-AK ebenfalls auf enzymimmunologischer Grundlage nach, zeigen jedoch im Gegensatz zum ELISA von ORG eine signifikant geringere Sensitivität (41,3% und 46% vs. 78,4%,  $p < 0,0005$ ) und eine signifikant höhere Spezifität (97,5% und 96,2% vs. 80,6%,  $p < 0,0005$ ).

Mehrere Ursachen für die Divergenz der Ergebnisse bei den unterschiedlichen ELISA-Testsystemen können die Befunde erklären. So gibt es isotypenspezifische ELISA-Testsysteme, die nur IgG-AK detektieren, wie auch die drei Assays in dieser Studie. Andererseits gibt es Systeme, die sowohl IgG-

als auch IgM-AK messen (Egner W 2000). Die IgM-AK werden jedoch häufiger bei anderen rheumatischen oder nicht-rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen (Preud'homme JL et al. 1988). Die verwendeten Ag, die sehr unterschiedlich sein können, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. TBS und EUR verwenden hochgereinigte Ag tierischer Herkunft (TBS: gereinigte Kalbsthymus-DNA, EUR: gereinigte doppelsträngige Lachshoden-DNA), während bei ORG rekombinante humane dsDNA als Ag eingesetzt wird. Beim Monitoring der Erkrankung ist der ELISA von ORG aufgrund seiner hohen diagnostischen Sensitivität den anderen ELISA und dem entsprechend ist die Verwendung rekombinanter humaner Ag bei der Bestimmung humaner AK den hochgereinigten Ag tierischer Herkunft vorzuziehen.

Der Farr-RIA von DPC hatte eine etwas geringere Sensitivität als der ELISA von ORG (71,4% vs. 78,4%), wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant war. Der Farr-RIA von DPC zeichnete sich aber durch eine hohe diagnostische Spezifität aus (95,9%,  $p < 0,0005$ ). Die geringere Sensitivität lässt sich darauf zurückführen, dass der Farr-RIA nur hochaffine AK aller Isotypen erfasst. Die hohe Ionenkonzentration der Ammoniumsulfatlösung, die für die Fällung der Immunkomplexe verwendet wird, verursacht eine Trennung der radioaktiv markierten DNA von den niederaffinen AK (Hahn BH 1998, Shen GQ et al. 1998, Egner W 2000, Salonen EM et al. 2004). Da dieser Assay die niederaffinen AK nicht erfasst, ist der Test zwar weniger sensitiv, jedoch weitaus krankheitsspezifischer. Diese jedoch insgesamt noch hohe Sensitivität und die hohe Spezifität führen zur signifikant höchsten diagnostischen Effizienz (90,4% vs. 80,1% bis 85%,  $p < 0,05$  bis  $p < 0,0005$ ) dieses Assays, verglichen mit den anderen Testsystemen.

Der FIA von PHA verwendet zirkuläre Plasmid-DNA als Ag. Hierdurch wird das Risiko minimiert, dass ssDNA entstehen, wodurch das Ergebnis verfälscht werden könnte. Dieser Test zeichnete sich durch seine sehr hohe Spezifität (97,5%) aus, zeigte jedoch eine vergleichsweise signifikant geringere Sensitivität als Farr-RIA von DPC und ELISA von ORG (38,4% vs. 71,4% und 78,4%,  $p < 0,0005$ ). Einige Autoren zeigten in ihren Untersuchungen ähnliche

Ergebnisse, wobei die Sensitivität zwischen 39,5% und 64% und die Spezifität zwischen 93,2% und 95,8% lagen (Derksen RHW et al. 2002, Hernando M et al. 2002, Villalta D et al. 2002). Die Frage, ob nur hochaffine Anti-dsDNA-AK mit dem FIA von PHA detektiert werden, wie es von dem Hersteller vorgestellt wurde, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. In einer Studie von Villalta D et al. 2002 konnte diese Aussage nicht bestätigt werden.

Alle fünf Assays zeigten in der gemessenen AK-Konzentration eine hochsignifikante Korrelation untereinander ( $p < 0,0001$ ). Somit erscheinen die verschiedenen Assays einander ebenbürtig. Die engste Assoziation der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen wurde zwischen Farr-RIA von DPC und ELISA von TBS gefunden ( $r = 0,82$ ). Der FIA von PHA zeigte jedoch die schlechtesten Korrelationsergebnisse im Vergleich zu den anderen Assays ( $r = 0,59$  bis  $r = 0,66$ ).

Die höchste Konkordanz erreichten die beiden ELISA von TBS und EUR ( $k = 94,4\%$ ). Dieses Ergebnis ist eventuell auf das gleiche Testsystem und die verwendeten hochgereinigten tierischen Ag zurückzuführen. Die geringste Konkordanz zeigte ELISA von ORG ( $k = 77,4\%$  bis  $81,8\%$ ). Hier spiegelt sich die signifikant geringere Spezifität wider.

Zur Frage, inwieweit Änderungen der Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in individuellen Patienten mit der SLE-Krankheitsaktivität korreliert, gibt es keine einheitlichen Befunde. Während einige Studien zeigen, dass die Anti-dsDNA-AK im Serum schon Wochen vor einer klinischen Exazerbation ansteigen (Ter Borg EJ et al. 1990, Bootsma H et al. 1995), wird andererseits z.T. berichtet, dass bei Anstieg der Krankheitsaktivität die AK-Konzentration sogar abfällt (Ho A et al. 2001) oder keine signifikanten Änderungen aufweist (van den Berg L et al. 2006, Esdaile JM et al. 1996).

In unserer Studie erfolgten keine follow-up Untersuchungen der Patienten, weshalb nicht geklärt werden konnte, ob Änderungen der Anti-dsDNA-AK-Konzentration einem Krankheitsrückfall vorausgehen. Jedoch fiel in der Querschnittsbetrachtung des SLE-Patientenkollektivs auf, dass sowohl die Prävalenz der Anti-dsDNA-AK als auch eine höhere Konzentration der AK mit



einer höheren Krankheitsaktivität (gemessen im SLEDAI-2K-Score) assoziiert waren. Alle fünf Assays zeigten signifikante Unterschiede in der AK-Konzentration bei Patienten mit inaktivem SLE und gering aktivem SLE bzw. zwischen inaktivem und aktivem SLE. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich zwischen dem gering aktivem und aktivem SLE. Die Aussage von Hernando et al. 2002, dass der FIA von PHA bei aktivem SLE eine signifikant höhere diagnostische Sensitivität von 70,8% erreicht, konnte von uns nicht bestätigt werden. Der Unterschied der diagnostischen Sensitivität zwischen aktivem SLE und Gesamt-SLE war beim FIA von PHA nicht signifikant (54,5% vs. 38,4%). Einige Studien zeigen, dass sich niederaffine AK gegen ssDNA und/oder dsDNA im Laufe der fortschreitenden Immunantwort immer deutlicher und mit steigender Affinität gegen dsDNA richten (Desai DD et al. 1993, Krishnan MR et al. 1993, Fredriksen K, Osei A et al. 1994, Fredriksen K, Brannsether B et al. 1991, Moens U et al. 1995). Dies ist eine mögliche Erklärung, dass die Prävalenz von Anti-dsDNA-AK bei Farr-RIA von DPC, der auf hochaffine Anti-dsDNA-AK begrenzt ist, mit Zunahme der Krankheitsaktivität die Werte des ELISA von ORG erreicht. Da der Farr-RIA sehr spezifisch für SLE ist und ausschließlich hochaffine AK erfasst, könnte es sich nachteilig auf den Nachweis der Anti-dsDNA-AK bei der milden Form des SLE, die vorwiegend durch die niederaffinen Anti-dsDNA-AK gekennzeichnet sind, auswirken. Andererseits wird beschrieben, dass Anti-dsDNA-AK vom Isotyp IgM mit einer geringeren Krankheitsaktivität assoziiert sind. Diese AK werden wiederum von Farr-RIA und nicht vom ELISA erfasst. In dieser Studie bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Prävalenz zwischen dem Farr-RIA von DPC und dem ELISA von ORG bei inaktivem SLE, so dass sich beide oben beschriebenen Effekte am ehesten gegenseitig aufheben.

Obwohl die quantitative Bestimmung von Anti-dsDNA-AK hilfreich für die Unterscheidung zwischen inaktivem und aktivem SLE sein kann, sollte sie nicht als alleiniges Kriterium für die Krankheitsaktivität benutzt werden. Andere Parameter wie der Verbrauch der Komplementfaktoren C3c und C4, der Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität CH50 oder der Nachweis

zirkulierender Immunkomplexe, liefern nützliche, ergänzende Informationen im Hinblick auf die Krankheitsaktivität (Wais T et al. 2003, Ramos-Casals M et al. 2004).

In dieser Studie wurde die Untersuchung auf den Verbrauch der Komplementfaktoren C3c und C4 beschränkt, da sich diese durch eine standardisierte immunonephelometrische Messung besonders gut für das Krankheitsmonitoring eignen. Mit Zunahme der Krankheitsaktivität nahm der Komplementverbrauch zu, was auf die vermehrte Bildung der Immunkomplexe aus Anti-dsDNA-AK und Komplementfaktoren zurückgeführt werden kann (Lloyd W, Schur PH 1981, Ward MM et al. 1989, Spronk PE et al. 1995, Fernando MMA et al. 2005). Die Anti-dsDNA-AK, die mit den fünf Assays bestimmt wurden, und die Komplementfaktoren C3c korrelierten invers und ähnlich stark miteinander ( $r = -0,52$  bis  $r = -0,47$ ). Die Komplementfaktoren C4 zeigten ebenfalls eine inverse jedoch eine geringere Korrelation ( $r = -0,42$  bis  $r = -0,28$ ). Es lässt sich daraus folgern, dass die Bestimmungen vor allem der Komplementfaktoren C3c, zum Monitoring und Einschätzung der Erkrankungsaktivität des SLE eingesetzt werden kann.

Die medikamentöse Immunsuppression ist bei SLE sehr vielfältig. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sowohl die Prävalenz der Anti-dsDNA-AK als auch deren Konzentrationen bei allen Assays mit dem Umfang der medikamentösen Therapie assoziiert waren. Die Krankheitsaktivität war bei Patienten mit der intensivsten Therapie am höchsten. Auffällig war, dass der ELISA von ORG auch in der Patientengruppe ohne medikamentösen Therapie eine hohe Prävalenz an AK aufwies (82,6% vs. 30,4 bis 60,9% bei den anderen verwendeten Assays), was auf den Nachweis der niederaffinen AK in der inaktiven Krankheitsphase zurückgeführt werden kann.

Von allen Organbeteiligungen des SLE hat der Befall der Niere meist den gravierendsten Einfluss auf die Prognose der Erkrankung. Teilpopulationen der Anti-dsDNA-AK, vor allem die hochaffinen IgG-AK, sind möglicherweise an der Pathogenese der Lupusnephritis beteiligt, allerdings ist die Pathogenese der Nephritis beim SLE nicht umfassend geklärt. (Winfield JB et al. 1977, Raz E et

al. 1989, Okamura M et al. 1993, Van Bruggen MC et al. 1997, D'Andrea DM et al. 1996, Van Bruggen MC, Kramers C et al. 1996, Deocharan B et al. 2002, Villalta D et al. 2003, Rekvig OP et al. 2004, Haugbro K et al. 2004, Avihingsanon Y et al. 2010). Patienten, bei denen eine Nierenbeteiligung nachgewiesen werden konnte, waren im Durchschnitt zwei Jahre länger krank und die Krankheit wies eine höhere Aktivität auf. Laut Yee CS et al. 2003 ist die Organschädigung signifikant mit dem Lebensalter und der Krankheitsdauer assoziiert. Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur wurden trotz der höheren Krankheitsaktivität bei den Patienten mit einer Nierenbeteiligung weder ein vermehrter Komplementverbrauch, noch signifikant höhere Prävalenzen an Anti-dsDNA-AK bzw. höhere Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen in unserem Kollektiv nachgewiesen (Lloyd W et al. 1981, Swaak AJ et al. 1986, Baqi N et al. 1996, Shen GQ et al. 1998, Villalta D et al. 2002, Cortes-Hernandez J et al. 2004). Diese Ergebnisse sind möglicherweise auf die relativ kleine Anzahl der Patienten mit einer Nierenbeteiligung zurückzuführen (n=33). Die stärkste, jedoch nicht signifikante, Zunahme der Prävalenz von Anti-dsDNA-AK bei den Patienten mit Nierenbeteiligung zeigte der Farr-RIA von DPC. Es ist ein möglicher Hinweis darauf, dass bei der Schädigung der Nieren vor allem hochaffine Anti-dsDNA-AK eine große Rolle spielen.

Der IFT auf HEp-2 Zellen als Substrat wird in der Routinediagnostik als ein Screening-Test eingesetzt. Es wird empfohlen, nur die positiven Ergebnisse weiter zu differenzieren (James K 1992). Viele Seren wurden routinemäßig mit diesem Test untersucht und die Daten wurden in der Studie verwendet. Da die verfügbaren Anti-dsDNA-Assays sich zum Teil erheblich in ihrer diagnostischen Sensitivität, Spezifität, Effizienz und ihren prädiktiven Werten unterscheiden, untersuchten wir, ob die Serodiagnostik des SLE durch Kombination von mittels IFT erhobenen ANA-Befunden mit den Resultaten von Anti-dsDNA-Assays verbessert werden kann. Unter Verwendung herstellerspezifischer Cutoff-Werte traten signifikante Unterschiede zwischen den Anti-dsDNA-Assays bei der diagnostischen Sensitivität (38,4% bis 78,4%,  $p < 0.0005$ ) und Spezifität (75,6% bis 96,8%,  $p < 0.0005$ ) auf. Der Farr-RIA von DPC erzielte als Einzeltest die

höchste diagnostische Effizienz (87,7%, Vergleichstests 76,4% bis 80,8%). Im IFT war das Fluoreszenzmuster „homogen, chromosomen-positiv“ eng mit Anti-dsDNA-AK assoziiert und zeigte bei hoher diagnostischer Spezifität (94,8%) eine den Anti-dsDNA-Assays vergleichbare diagnostische Sensitivität (43,7%) und Effizienz (78,5%). Das kombinierte Kriterium (ANA-Muster hom+ und gleichzeitig Positivität im Anti-dsDNA-Assay) resultierte im Vergleich zum jeweiligen isolierten Anti-dsDNA-Befund in einer signifikant höheren diagnostischen Spezifität (jeweils >97%) und positiv prädiktiven Werten zwischen 88,1% und 97,3% (Einzeltests 56,3% bis 82,5%). Dies war allerdings mit einer reduzierten Sensitivität (23,2% bis 41,6%) und niedrigeren negativ prädiktiven Werten (73,6% bis 77,9%) bezogen auf den jeweiligen Anti-dsDNA-Assay (80,5% bis 89,7%) verbunden, während die diagnostische Effizienz mit Ausnahme der Kombination IFT/Farr-RIA von DPC (79,6% vs. 87,7%) unverändert blieb. Zudem führte die Anwendung des kombinierten Kriteriums zu einer vergleichbaren diagnostischen Effizienz zwischen den verschiedenen Anti-dsDNA-Assays.

Unsere Ergebnisse belegen, dass bei der Serodiagnostik des SLE in einem rheumatologischen Patientenkollektiv die Kombination aus IFT mit Nachweis des Fluoreszenzmusters hom+ und positivem Anti-dsDNA-Test aufgrund höherer Spezifität und positiv prädiktiver Werte einem isolierten Nachweis von Anti-dsDNA-AK überlegen ist. Die Heterogenität kommerzieller Anti-dsDNA-Assays hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft kann mit dieser Vorgehensweise weitgehend reduziert werden. Es ist zu erwähnen, dass die hohen prädiktiven Werte auf die hohe Prävalenz der SLE-Patienten in dem Studienkollektiv, die nicht der Realität entspricht, zurückzuführen sind.

Ein Grund für voneinander abweichende Ergebnisse unterschiedlicher, Wo/80-standardisierter Testsysteme dürfte darin zu sehen sein, dass die diagnostische Sensitivität und Spezifität und somit auch die diagnostische Effizienz, sehr stark von den Cutoff-Wertangaben der Hersteller abhängig sind. Die Festlegung erfolgt in der Regel mit unselektionierten Blutspenderkollektiven und nicht anhand klinisch eindeutig definierter Patientenkollektive. In dieser Studie wurde

die ROC-Kurvenanalyse mit dem wichtigsten differentialdiagnostischen Kollektiv, dem NSLE-Kollagenosen-Kollektiv, durchgeführt. Die größte AUC und dem entsprechend die beste Unterscheidung zwischen den Krankheiten SLE und NSLE-Kollagenosen wies der Farr-RIA von DPC auf. Der Unterschied wurde jedoch nur zwischen Farr-RIA von DPC und ELISA von EUR signifikant ( $AUC=0,85$  vs.  $AUC=0,78$ ,  $p=0,016$ ). Ähnliche Ergebnisse beschrieben Wasmuth JC et al. 2004.

Nach der Optimierung der Cutoff-Werte lässt sich eine höhere diagnostische Effizienz auch bei den nicht radioaktiven Tests erreichen. Unserer Untersuchung kann man entnehmen, dass man nicht ohne weiteres die Hersteller-Cutoff-Werte übernehmen sollte. Lediglich bei Farr-RIA von DPC war der Hersteller-Cutoff-Wert so gut gewählt, dass die Optimierung keine Verbesserung der diagnostischen Effizienz erbrachte. Bei den anderen Assays mussten die Cutoff-Werte teilweise sehr stark angepasst werden.

## 5. Schlusswort

Die Messung der Anti-dsDNA-AK wird sehr häufig in der SLE-Diagnostik und auch zur Verlaufsbeurteilung der Erkrankung (Monitoring) eingesetzt. Jeder einzelne Anti-dsDNA-Assay ist durch eine unterschiedliche diagnostische Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet. Ein idealer Anti-dsDNA-Assay würde hoch spezifisch und sensitiv sein und somit hohe positiv und negativ prädiktive Werte haben. Jedoch kann kein Test alle diese Anforderungen in gleichem Maße erfüllen, da eine Erhöhung der Spezifität meist zur Abnahme der Sensitivität führt. Weil Anti-dsDNA-AK bei vielen anderen Erkrankungen und auch bei gesunden Menschen vorkommen können, müssen diagnostische Tests v.a. hochspezifisch sein. Sensitive Tests sind hingegen gut für das Monitoring der Erkrankung geeignet (Hernando M et al. 2002).

Während ein positiver Test die Diagnose SLE unterstützt, schließt ein negativer Test die Diagnose jedoch nicht aus. Zwar korrelieren die Anti-dsDNA-AK-Konzentrationen teilweise mit der SLE-Erkrankungsaktivität, jedoch sollten die Ergebnisse stets im Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik gewertet werden.

Besteht die Möglichkeit, mehrere Tests im Labor anzuwenden, so sollte nach den Ergebnissen unserer Untersuchung, primär der ELISA von ORG als Screening-Test eingesetzt werden, da er mit seiner hohen Sensitivität alle Verdachtsfälle erfassen würde. Für die Bestätigungstests bei positiv ausfallendem Screening-Test könnte anschließend einer der anderen Tests (Farr-RIA von DPC, FIA von PHA, ELISA von TBS und ELISA von EUR) eingesetzt werden, der dann mit seiner hohen Spezifität die Anwesenheit von AK bestätigen oder widerlegen könnte.

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Farr-RIA von DPC, trotz seiner Nachteile wie Radioaktivität, größerer Zeitaufwand und höhere Kosten, sowohl den ELISA als auch dem FIA überlegen ist durch die Kombination aus seiner hohen diagnostischen Spezifität und guten diagnostischen Sensitivität. Daher kann dieser Test als alleiniger Test in der Diagnostik und auch im Monitoring von SLE empfohlen werden.

Unter den ELISA ist der Assay von ORG den anderen beiden Assays vorzuziehen. Hernando M et al. 2002 und Villalta D et al. 2002 zeigten, dass der FIA von PHA durch seine hohe diagnostische Spezifität und seine gute diagnostische Sensitivität sowohl in der Diagnostik als auch beim Monitoring gut einsetzbar ist. Wir teilen die Meinung von Derksen RHW et al. 2002, die zeigten, dass der FIA von PHA dem Farr-RIA unterlegen ist. Der FIA von PHA ist allerdings aufgrund der Automatisierung sehr attraktiv und könnte wegen seiner hohen diagnostischen Spezifität in der Diagnostik gut eingesetzt werden, jedoch sollten beim Monitoring sensitivere Testsysteme bevorzugt werden. Durch die Optimierung der Cutoff-Werte der nicht radioaktiven Tests lässt sich eine bessere diagnostische Effizienz erzielen, sodass die Tests dem Farr-RIA von DPC nur unwesentlich unterlegen oder gar ebenbürtig sind.

Trotz der zahlreichen Labortests sollte man sich allerdings nicht allein auf die Laborergebnisse verlassen oder gar auf die klinischen Untersuchungen verzichten. Auf diesem Wege können Veränderungen der Krankheitsaktivität bei den SLE-Patienten meist besser erfasst werden. Zudem sind Fälle von seronegativem SLE bekannt, in denen die Diagnose anhand der klinischen Befunde gestellt wird. (Fortin PR et al. 1995, Esdaile JM et al. 1996, Bohan A 1979, Cervera R et al. 2002).

## 6. Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Markenzeichen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ACR	American College of Rheumatology
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AI	Autoimmun
AIH	Autoimmunhepatitis
AK	Antikörper
AKO	Alle Kontrollen
ANA	antinukleäre Antikörper
Anti-dsDNA-AK	Antikörper gegen Doppelstrang-DNA
AntiM	Anti-Malaria-Mittel
Aqua dest.	Aqua destillata
AUC	area under curve
AZA	Azathioprin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall
CLIFT	Immunofluoreszenztest mit <i>Crithidia luciliae</i> als Substrat



CPh	Cyclophosphamid
CREST	Synonym: Sklerodermie
CsA	Ciclosporin A
d. h.	das heißt
diagn.	diagnostisch
DNA	Desoxyribonucleic acid
dl	Deziliter
DM	Dermatomyositis
DPC	Assay von DPC Biermann®
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EUR	Assay von Euroimmun®
Fa.	Firma
Farr-RIA	nach Richard Farr benannter Radioimmunoassay
FIA	Fluoreszenz-Immunoassay
FN	falsch-negativ
FP	falsch-positiv
FTA	Fluoreszenz-Treponema-Antikörper
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GK	Gesamtkollektiv

GKO	gesundes Kontrollkollektiv
gp210	nuclear pore glycoprotein-210
HCV	Hepatitis C-Virus
HEp	Humane Epitheliomzelllinie
Hep C	Hepatitis C-Infektion
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hom+	homogen chromosomen-positiv
IFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Infekt.	Infektionen
IU	international unit
J	Jod
k	Konkordanzkoeffizient
LE	Lupus erythematodes
LED	Leuchtdiode
log	Logarithmus
M.	Morbus
MCDT	Mixed connective tissue disease (Mischkollagenose)
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMF	Mycophenolatmofetil
mPAN	mikroskopische Panarteriitis nodosa
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
neg.	negativ
NKOLL	Nicht-Kollagenosen
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NSLE	Nicht-SLE
NSLE-Erkr.	Nicht-SLE-Erkrankte
NSLE-Koll.	Nicht-SLE-Kollagenosen
OD	Optische Dichte
ORG	Assay von ORGenTec®
PAN	Panarteriitis nodosa
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBS	Phosphatpuffer
PHA	Assay von Pharmacia®
PM	Polymyositis
pos.	positiv
präd.	prädiktiv
Prim.	Primäre

PsoA	Psoriasisarthritis
PSS	progressiv systemische Sklerose
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
RIA	Radioimmunoassay
RN	richtig-negativ
RNA	ribonucleic acid
ROC	Receiver Operating Characteristic
RP	richtig-positiv
ScI	Sklerodermie
SD	Thyreopathien
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SLEDAI-2K	SLE Disease Activity Index 2000
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Std.	Stunden
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
s.u.	siehe unten
Syst. Arthr.	Systemische Arthritis
Tab.	Tabelle
TBS	Assay von Binding Site®
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TPHA	Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Assay
U	Unit
U1-RNP	uridinreiches Ribonucleoprotein
u.a.	unter anderem
UV-Strahlen	Ultra-violett-Strahlen
Vask.	Vaskulitis
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

1. **American College of Rheumatology ad hoc Committee on sytemic lupus erythematosus guidelines** (1999) Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. *Arthritis Rheum* 42: 1785-1796
2. **Ando DG**, Sercatz EE, Hahn BH (1987) Mechanisms of T and B cell collaboration in the in vitro production of anti-DNA antibodies in the NZB/NZW F1 murine SLE model. *J Immunol* 138: 3185-3190
3. **Arbuckle MR**, James JA, Kohlhase KF, Rubertone MV, Dennis GJ, Harley JB (2001) Development of anti-dsDNA antibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol* 54: 211-219
4. **Arbuckle MR**, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB (2003) Developement of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349: 1526-1533
5. **Avihingsanon Y**, Hirankarn N (2010) Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus* 19(12): 1391-8
6. **Baqi N**, Moazami S, Singh A, Ahmad H, Balachandra S, Tejani A (1996) Lupus nephritis in children: a longitudinal study of prognostic factors and therapy. *J Am Soc Nephrol* 7: 924-929
7. **Bobeck MJ**, Rueda D, Walter NG, Glick GD. (2007) Structural modeling of sequence specificity by an autoantibody against single-stranded DNA. *Biochemistry* 46(23): 6753-65
8. **Bohan A** (1979) Seronegative systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 6: 534-540

9. **Bombardier C**, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH and the Committee on prognosis studies in SLE (1992) Derivation of the SLEDAI. *Arthritis Rheum* 35: 630-640
10. **Bootsma H**, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wolters-Dicke H, Hermans J, Limburg P, Gmelig-Meyling F, Kater L, Kallenberg C (1995) Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 345: 1595-1599
11. **Ceppellini R**, Polli E, Celada F (1957) A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96: 572-574
12. **Cervera R on behalf of the European Party on Systemic Lupus Erythematosus** (2002) Lessons from the "Euro-Lupus Cohort". *Ann Med Interne* 153: 530-536
13. **Chan EYT**, Ko OKH, Lawton JWM, Lau CS (1998) The use of anti-ribosomal P antibodies in the diagnosis of cerebral lupus-superiority of western blotting over enzyme-linked immunosorbent assay. *Hong Kong Med J* 4: 145-50
14. **Committee on Prognosis Studies** (1986) Prognosis studies in SLE: an activity index [abstract]. *Arthritis Rheum* 29 Suppl 4: S93
15. **Cortes-Hernandez J**, Ordi-Ros J, Labrador M, Bujan S, Balada E, Segarra A, Vilardell-Tarres M (2004) Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 116: 165-173

16. **D'Andrea DM**, Coupaye-Gerard B, Kleyman TR, Foster MH, Madaio MP (1996) Lupus autoantibodies interact directly with distinct glomerular and vascular cell surface antigens. *Kidney Int* 49: 1214-1221
17. **Delgado-Vega A**, Sánchez E, Löfgren S, Castillejo-López C, Alarcón-Riquelme ME (2010) Recent findings on genetics of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 22(6): 698-705
18. **Deocharan B**, Qing X, Berger E, Putterman C (2002) Antigenic triggers and molecular targets for anti-double-stranded DNA antibodies. *Lupus* 11: 865-871
19. **Derksen RHWM**, Bast EJEG, Strooisma T, Jacobs JWG (2002) A comparison between the Farr radioimmunoassay and a new automated fluorescence immunoassay for the detection of antibodies against double stranded DNA in serum. *Ann Rheum Dis* 61: 1099-1102
20. **Desai DD**, Krishnan MR, Swindle JT, Marion TN (1993) Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J Immunol* 151: 1614-1626
21. **Egner W** (2000) The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Clin Pathol*: 53: 424-432
22. **Emlen W**, Niebur J, Kadera R (1994) Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152: 3685-3692
23. **Esdaile JM**, Abrahamowicz M, Joseph L, MacKenzie T, Li Y, Danoff D (1996) Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. Why some tests fail. *Arthritis Rheum* 39: 370-378



- 24. Fernando MMA**, Isenberg DA (2005) How to monitor SLE in routine clinical practice. *Ann Rheum Dis* 64: 524-527
- 25. Fortin PR**, Abrahamowicz M, Danoff D (1995) Small changes in outpatients lupus activity are better detected by clinical instruments than by laboratory tests. *J Rheumatol* 22: 2078-2083
- 26. Fredriksen K**, Brannsether B, Traavik T, Rekvig OP (1991) Antibodies to viral and mammalian native DNA in response to BK virus inoculation and subsequent immunization with calf thymus DNA. *Scand J Immunol* 34: 109-119
- 27. Fredriksen K**, Osei A, Sundsfjord A, Traavik T, Rekvig OP (1994) On the biological origin of anti-double stranded (ds) DNA antibodies: systemic lupus erythematosus-related anti-dsDNA antibodies are induced by polyomavirus BK in lupus-prone (NZBxNZW) F1 hybrids, but not in normal mice. *Eur J Immunol* 24: 66-70
- 28. Ginzler EM**, Diamond HS, Weiner M et al. (1982) A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. I. Entry variables as predictors of prognosis. *Arthritis Rheum* 25: 601-611
- 29. Gladman DD**, Ibanez D, Urowitz MB (2002) Systemic lupus erythematosus disease activity Index 2000. *J Rheumatol* 29: 288-291
- 30. Gladman DD**, Urowitz MB, Kagal A, Hallett D (2000) Accurately describing changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 27: 377-379
- 31. Gladman DD**, Urowitz MB, Ong A, Gough J, MacKinnon A (1996) Lack of correlation among the 3 outcomes describing SLE: disease activity, damage and quality of life. *Clin Exp Rheumatol* 14: 305-308

32. **Greer JM**, Panush RS (1989) Incomplete lupus erythematosus. Arch Intern Med 149: 2473-2476
33. **Gualtierotti R**, Biggioggero M, Penatti AE, Meroni PL (2010) Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Autoimmune Rev 10(1): 3-7
34. **Hahn BH** (1998) Mechanisms of disease: antibodies to DNA. N Engl J Med 338: 1359-1368
35. **Hargraves MM**, Richmond H, Morton R (1948) Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and the "LE" cell. Proc Staff Meet Mayo Clin 23: 25-28
36. **Hasan T**, Pertovaara M, Yli-Kerttula U, Luukkaala T, Korpela M (2004) Seasonal variation of disease activity of systemic lupus erythematosus in Finland: a 1 year follow up study. Ann Rheum Dis 63(11): 1498-500
37. **Haugbro K**, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP (2004) Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. Ann Rheum Dis 63: 386-394
38. **Hernando M**, Gonzalez C, Sanchez A, Guevara P, Navajo JA, Papisch W, Gonzalez-Buitrago JM (2002) Clinical evaluation of a new automated anti-dsDNA fluorescent immunoassay. Clin Chem Lab Med 40 (10): 1056-1060
39. **Herrmann M**, Winkler T, Gaipl U, Lorenz HM, Geiler T, Kalder JR. (2000) Etiopathogenesis of Systemic lupus erythematosus. Int Arch Allergy Immunol 123: 28-35

40. **Ho A**, Magder LS, Barr SG, Petri M. (2001) Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44(10): 2342-9
41. **Hochberg MC** (1990) Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 16: 617-639
42. **Holborow J**, Weir DM, Johnson GD (1957) A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *BMJ* 2: 732-734
43. **James K**, Meek G (1992) Evaluation of commercial enzyme immunoassays compared to immunofluorescence and double diffusion for autoantibodies associated with autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 97: 559-565
44. **Kadlubowski M**, Jackson M, Yap PL, Neill G (1991) Lack of specificity for antibodies to double stranded DNA found in four commercial kits. *J Clin Pathol* 44: 246-250
45. **Kalden JR** (1996) Pathogenic aspects of systemic lupus erythematosus. *Isr J Med Sci* 32: 3-6
46. **Kavanaugh A**, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA (1999) Guidelines for clinical use of the antinuclear antibodies test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch pathol lab med* 124: 71-81
47. **Klemperer P**, Pollach AD, Baehr G (1941) Pathology of disseminated lupus erythematosus. *Arch Path* 33: 396-613
48. **Klippel JH** (1997) Systemic lupus erythematosus: demographics, prognosis, and outcome. *J Rheumatol (suppl 48)* 24: 67-71

- 49. Krishnan MR, Marion TN (1993)** Structural similarity of antibody variable regions from immune and autoimmune anti-DNA antibodies. *J Immunol* 150: 4948-4957
- 50. Lloyd W, Schur PH (1981)** Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore)* 60: 208-217
- 51. Makowski GS, Ramsby ML (2003)** Selective detection of autoimmune antibodies to single- and double-stranded DNA by enzyme immunoassay. *Ann Clin Lab Sci* 33: 142-148
- 52. Metz CE (1978)** Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 8: 309-353
- 53. Mills JA (1994)** Medical progress: Systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 330: 1871-1879
- 54. Moens U, Seternes OM, Hey AW, Silsand Y, Traavik T, Johansen B, Rekvig OP (1995)** In vivo expression of a single viral DNA-binding protein generates systemic lupus erythematosus-related autoimmunity to double-stranded DNA and histones. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12393-12397
- 55. Mutasim DF, Adams BB (2000)** A practical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue diseases. *J Am Acad Dermatol* 42: 159-174
- 56. Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, Swaak AJ (1989)** Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool. *Ann Rheum Dis* 48: 748-752
- 57. Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N, Kohda S, Takeda T, Inoue T (1993)** Significance of enzyme immunosorbent assay (ELISA) of antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with

lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis* 52: 14-20

- 58. Pistiner M**, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR (1991) Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum* 21: 55-64
- 59. Preud'homme JL**, Rochard E, Gouet D, Danon F, Alcalay M, Touchard G, Aucouturier P (1988) Isotypic distribution of anti-double-stranded DNA antibodies: a diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn Clin Immunol* 5: 256-261
- 60. Ramos-Casals M**, Campoamor MT, Chamorro A, Salvador G, Segura S, Botero JC, Yague J, Cervera R, Ingelmo M, Font J (2004) Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. *Lupus* 13: 777-783
- 61. Raz E**, Brezis M, Rosenmann E, Eilat D (1989) Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 142: 3076-3082
- 62. Reichlin M**, Harley JB, Lockshin MD (1992) Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35: 457-464
- 63. Rekvig OP**, Kalaaji M, Nossent H (2004) 3: Anti-DNA antibody subpopulations and lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 3: 1-6
- 64. Rekvig OP**, Nossent JC (2003) Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48: 300-312

- 65. Robbins WC**, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG (1957) Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med* 96: 575-579
- 66. Robertson CA**, Vyse TJ (2000) The genetics of systemic lupus erythematosus. *Exp Nephrol* 8: 194-202
- 67. Rothfield NF** (1977) The kidney in systemic lupus erythematosus. *Contrib Nephrol* 7: 128-142
- 68. Ruffatti A**, Calligaro A, Del Ross T, Bertoli MT, Doria A, Rossi L, Todesco S (1990) Anti-double-stranded DNA antibodies in the healthy elderly: prevalence and characteristics. *J Clin Immunol* 10: 300-303
- 69. Salonen EM**, Miettinen A, Walle TK, Koskenmies S, Kere J, Julkunen H (2004) Anti-telomere antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE): a comparison with five antinuclear antibody assays in 430 patients with SLE and other rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 63: 1250-1254
- 70. Sauter M**, Anders HJ (2007) Lupus nephritis. *Minerva Med* 98(6): 749-58
- 71. Sawalha AH**, Harley JB (2004) Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 16: 534-540
- 72. Schmiedeke T**, Stoeckl F, Müller S, Sugisake Y, Batsford S, Woitas R, Vogt A (1992) Glomerular immune deposits in murine lupus models contain histones. *Clin exp Immunol* 90: 453-458
- 73. Seleznick MJ**, Fries JF (1991) Variables associated with decreased survival in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 21: 73-80

- 74. Shen GQ**, Shoenfeld Y, Peter JB (1998) Anti-DNA, antihistone, and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus. *Clin Rev Allergy Immunol* 16: 321-334
- 75. Shinjo SK**, Bonfá E, Wojdyla D, Borba EF, Ramirez LA, Scherbarth HR, Brenol JC et al. (2010) Antimalarial treatment may have a time-dependent effect on lupus survival: data from a multinational Latin American inception cohort. *Arthritis Rheum* 62(3): 855-62
- 76. Smeenk R**, Brinkman K, van den Brink H, Termaat RM, Berden J, Nossent H, Swaak T (1990) Antibodies to DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Their role in the diagnosis, the follow-up and the pathogenesis of the disease. *Clin Rheumatol* 9: 100-110
- 77. Smeenk RJT**, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JHM, Swaak AJG (1991) Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatol Int* 11: 101-107
- 78. Smolen JS**, Steiner G (1998) Mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 41: 768-777
- 79. Spronk PE**, Limburg PC, Kallenberg CG (1995) Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 4: 86-94
- 80. Stockl F**, Müller S, Batsford S et al. (1994) A role for histones and ubiquitin in lupus nephritis. *Clin Nephrology* 41: 10-17
- 81. Stuart L**, Hughes J (2002) Apoptosis and autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant* 17: 697-700

- 82. Sulcebe G, Morcka K (1992)** Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 10: 255-261
- 83. Swaak AJ, Groenwold J, Bronsveld W (1986)** Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 45: 359-366
- 84. Swaak AJ, Nossent JC, Bronsveld W, Van Rooyen A, Nieuwenhuys EJ, Theuns L, Smeenk RJ (1989)** Systemic lupus erythematosus. I. Outcome and survival: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. *Ann Rheum Dis*. 48: 447-454
- 85. Swaak T, Smeenk R (1987)** Clinical significance of antibodies to double stranded DNA (dsDNA) for systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Rheumatol* 6: 56-73
- 86. Tan EM, Chan KL, Sullivan KF, Rubin RL (1988)** Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopath* 47: 121-141
- 87. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Green Schaller J, Talal N, Winchester RJ (1982)** The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277
- 88. 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 (1997)** Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 40: 1601-1611



- 89. Tan FK**, Arnett FC (1998) The genetics of lupus. *Curr Opin Rheumatol* 10: 399-408
- 90. Ter Borg EJ**, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG (1990) Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 33: 634-643
- 91. Thompson D**, Juby A, Davis P (1993) The clinical significance of autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2: 15-19
- 92. Tzioufas AG**, Terzoglou C, Stavropoulos ED, Athanasiadou S, Moutsopoulos HM (1990) Determination of anti-ds-DNA antibodies by three different methods: comparison of sensitivity, specificity and correlation with lupus activity index (LAI). *Clin Rheumatol* 9: 186-192
- 93. Ulvestad E**, Kanestrom A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ, Vollset SE (2000) Evaluation of diagnostic tests for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand. J. Immunol* 52: 309-315
- 94. Valchoyiannopoulos PG**, Karassa FB, Karakostas KX, Drosos AA, Moutsopoulos HM (1993) Systemic lupus erythematosus in Greece. Clinical features, evolution and outcome: a descriptive analysis of 292 patients. *Lupus* 2: 303-312
- 95. Van Bruggen MC**, Kramers C, Berden JH (1996) Autoimmunity against nucleosomes and lupus nephritis. *Ann Med Interne (Paris)* 147: 485-489
- 96. Van Bruggen MC**, Walgreen B, Rijke TP, Tamboer W, Kramers K, Smeenk RJ, Monestier M, Fournie GJ, Berden JH (1997) Antigen specificity of anti-

nuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur J Immunol* 27: 1564-1569

- 97. Van den Berg L**, Nossent H, Rekvig O (2006) Prior anti-dsDNA antibody status does not predict later disease manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 25(3): 347-52
- 98. Villalta D**, Bizzaro N, Corazza D, Tozzoli R, Tonutti E (2002) Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsDNA antibodies in SLE. *J Clin Lab Anal* 16: 227-232
- 99. Villalta D**, Romelli PB, Savina C, Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Ghirardello A, Doria A (2003) Anti-dsDNA antibody avidity determination by a simple reliable ELISA method for SLE diagnosis and monitoring. *Lupus* 12: 31-36
- 100. Vogt A**, Batsford S, Morioka T, Woitas R (1993) Changing concepts in the pathogenesis of lupus nephritis. In: Andreucci V. E, Fine L (eds.): *Yearbook of Nephrology 1993*, pp. 25-44. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio 1993
- 101. Wais T**, Fierz W, Stoll T, Villiger PM (2003) Subclinical disease activity in systemic lupus erythematosus: immunoinflammatory markers do not normalize in clinical remission. *J Rheumatol* 30: 2133-2139
- 102. Ward MM**, Pisetsky DS, Christenson VD (1989) Antidouble stranded DNA antibody assay in systemic lupus erythematosus: correlations of longitudinal antibody measurements. *J Rheumatol* 16: 609-613
- 103. Wasmuth JC**, Gruen B, Terjung B, Homrighausen A, Spengler U (2004) ROC Analysis Comparison of three assays for the detection of antibodies

against double-stranded DNA in serum for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Clin Chem 11: 2169-2171

- 104. Weening JJ**, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi L-M, Makino H, Moura LA, Nagata M (2004) The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. J Am Soc Nephrol 15: 241-250
- 105. Werle E**, Blazek M, Fiehn W (1992) The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a Crithidia luciliae immunofluorescence test. Lupus 1: 369-377
- 106. Wigand R**, Gottschalk R, Falkenbach A, Matthias T, Kaltwasser JP, Hoelzer D (1997) Zum dsDNA-Antikörpernachweis in der Diagnostik des Systemischen Lupus erythematosus – Vergleichende Untersuchungen zur diagnostischen Effizienz dreier ELISA-Verfahren mit unterschiedlichen Antigenen und einem Crithidia luciliae-Immunfluoreszenztest. Z Rheumatol 56: 53-62
- 107. Wigand R**, Gottschalk R, Kaltwasser JP, Hoelzer D (1996) Nachweis von anti-ds-DNA-Antikörpern: Vergleich der diagnostischen Effizienz eines ELISA mit rekombinantem humanen Antigen mit einem handelsüblichen ELISA und einem Crithidia luciliae-Immunfluoreszenztest. J Lab Med 20: 283-290
- 108. Winfield JB**, Faiferman I, Koffler D (1977) Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. J Clin Invest 59: 90-96

- 109. Winkler TH**, Kalden JR (1994) Editorial – Origin of anti-DNA autoantibodies in SLE. *Lupus* 3: 75-76
- 110. Witte T** (2008) IgM antibodies against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol* 34(3): 345-7
- 111. Witte T**, Hartung K, Matthias T, Sachse C, Fricke M, Deicher H, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE (1998) Association of IgA anti-dsDNA antibodies with vasculitis and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 18: 63-69
- 112. Witte T**, Hartung K, Sachse C, Matthias T, Fricke M, Deicher H, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE (1998) IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. *Rheumatol Int* 18: 85-91
- 113. Yee CS**, Hussein H, Skan J, Bowman S, Situnayake D, Gordon C (2003) Association of damage with autoantibody profile, age, race, sex and disease duration in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 42: 276-279
- 114. Zweig MH**, Campbell G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39: 561-577

## **Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Peter Willeke (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D) und Herrn Dr. Bernhard Schlüter (Centrum für Laboratriumsmedizin) danke ich für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung während der Erstellung der Dissertation.

Allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Frau Frankenmöller, und des Zentralarchivs möchte ich für die Einarbeitung, die stets kompetente Beratung und Hilfe danken. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten und des Instituts für Transfusionsmedizin, die mich bei der Probensammlung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der mir stets Hoffnung macht und mir jederzeit zur Seite steht. Danke!

