Relevanz des Anti-Dense-fine-speckled 70 (DFS70) - Autoantikörpers zum Ausschluss von Kollagenosen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Louisa-Marie Mockenhaupt-Mies

aus Kirchen (Sieg)

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. MUDr. Valentin Sebastian Schäfer
2. Gutachterin: Prof. Dr. Verena Tischler

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.03.2025

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	**Deutsche Zusammenfassung**	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	8
1.2.1	Patienten/-innen	8
1.2.2	Labordiagnostik	9
1.2.3	Statistische Analyse	12
1.3	Ergebnisse	12
1.3.1	Patientencharakteristika	12
1.3.2	Anti-DFS70-Antikörper bei Patienten/-innen mit Kollagenose	14
1.3.3	Sensitivität und Spezifität des Anti-DFS70-Autoantikörpers	17
1.3.4	Vorkommen von Anti-DFS70-Antikörpern und anderer krankheitsspezifischer Autoantikörper beim Vorliegen einer Kollagenose	18
1.3.5	Auftreten klinischer Zeichen und Symptome bei Kollagenose-Patienten bei Vorhandensein und Abwesenheit des Anti-DFS70-Autoantikörpers	21
1.4	Diskussion	23
1.5	Zusammenfassung	27
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2.	**Veröffentlichung**	33
3.	**Erklärung zum Eigenanteil**	34
4.	**Danksagung**	36

5. Publikation (PDF-Version) 37

Abkürzungsverzeichnis

ANA	Antinukleäre Antikörper
ENA	Extrahierbare nukleäre Antigen-Antikörper
DFS70	Dense fine speckled 70
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
Jo1	Histidyl tRNA Synthetase
nRNP/SM	Ribonukleoprotein/Smith
PM-Scl	Polymyositis- Sklerodermie
Scl	Sklerodermie
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
Sm	Smith
SSA	Sjögren Syndrom A
SSB	Sjögren Syndrom B

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Bei den Kollagenosen handelt es sich um systemische Autoimmunerkrankungen mit chronisch entzündlichen Prozessen, welche sich vorwiegend an Bindegewebe und Blutgefäßen manifestieren.

Prinzipiell kann sich das Immunsystem hierbei jedoch gegen jedes Organ richten (Altiok et al., 2018). Zu den klassischen Kollagenosen zählt der systemische Lupus erythematodes, das primäre Sjögren Syndrom, die systemische Sklerose, die Mischkollagenose und die Polymyositis und Dermatomyositis. Die undifferenzierte Kollagenose wiederum wird zur Beschreibung klinischer Entitäten verwendet, die durch klinische und serologische Manifestationen von systemischen Autoimmunerkrankungen gekennzeichnet sind, jedoch nicht die Kriterien für eine definierte Kollagenose erfüllen (Pepmueller, 2016).

Eine Diagnosesicherung ist häufig erschwert, da sich die beschriebenen Erkrankungen zu Beginn oft sehr unspezifisch mit einer Vielzahl unterschiedlicher klinischer Zeichen und Symptome wie Müdigkeit, Polyarthralgie, Polymyalgie, Gewichtsverlust, Fieber oder Kopfschmerzen manifestieren (Goldblatt und O'Neill, 2013).

Zur laborchemischen Kollagenose-Diagnostik gehört als Screening-Test die Bestimmung von sogenannten antinukleären Antikörpern (ANA). Sie sind serologische Marker für das Vorliegen systemischer Autoimmunerkrankungen, welche in Deutschland als Kollagenosen bekannt sind, (Mahler und Fritzler, 2010) und werden in der Regel durch einen indirekten Immunfloreszenztest (IIFT) auf menschlichen Epithelzellen (Hep-2-Zellen) nachgewiesen (Mahler und Fritzler, 2012). Dieses Verfahren gilt als Goldstandard in der Untersuchung von ANA (Wei et al., 2020).

Es wurde jedoch festgestellt, dass sich ANA auch bei bis zu 20 % gesunder Personen nachweisen lassen (Mahler et al., 2012). In diesen Fällen richtet sich die Mehrheit der ANA gegen das dense fine speckled 70 (DFS70) Antigen (Mahler et al., 2012).

Der Begriff leitet sich aus dem spezifischen dichten, fein gesprenkelten Muster im indirekten Immunfluoreszenztest und seinem Antigen mit einem Molekulargewicht von 70 kDa im Line-Immunoassey ab (Infantino et al., 2019).

Erstmals beschrieben wurden diese Anti-DFS70-Antikörper bei Patienten/-innen mit interstitieller Zystitis (Ochs et al., 2000). Anschließend detektierte man sie jedoch auch bei vielen anderen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (Ochs et al., 2000), chronisch entzündlichen Erkrankungen, Krebs (O'Rourke et al., 2012) und zudem bei gesunden Personen (Watanabe et al., 2004).

Da in vorherigen Studien festgestellt wurde, dass Anti-DFS70-Antikörper bei Patienten/-innen mit Kollagenosen seltener auftreten, wird dieser Antikörper von einigen Rheumatologen/-innen als Ausschlusskriterium für eine Kollagenose bei Vorhandensein von ANA vorgeschlagen (Mahler et al., 2012).

In unserer Klinik wird bei Verdacht auf eine Kollagenose ein IIFT im Rahmen der laborchemischen Untersuchung durchgeführt. Bei Nachweis von ANA erfolgt anschließend ein Line Immunoassay zum Nachweis anderer, für Kollagenosen typischer, Antikörper (Mockenhaupt et al., 2022). Im Rahmen dessen wird auch der Anti-DFS70-Autoantikörper bestimmt.

Unseres Wissens ist dies die erste Studie, welche den Anti-DFS70-Autoantikörper im Zusammenhang mit dem ANA-Titer, dem Auftreten Kollagenose-typischer klinischer Zeichen und Symptome als auch dem Auftreten anderer Kollagenose-typischer Autoantikörper in einer großen Kohorte untersucht (Mockenhaupt et al., 2022).

Folgende Fragestellungen untersuchen wir in unserer Studie: Kann eine Kollagenose durch das Vorhandensein des Anti-DFS70-Autoantikörpers sicher ausgeschlossen werden? Gibt es Kollagenose-Patienten/-innen, bei welchen der Anti-DFS70-Autoantikörper vorhanden ist, und lassen sich zwischen diesen Patient/-innen und Kollagenose-Patient/-innen ohne Anti-DFS-70-Autoantikörper klinische oder laborchemische Unterschiede feststellen?

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Patienten/-innen

In diese Studie wurden insgesamt 460 volljährige Patienten/-innen im Alter von 18 bis 81 Jahren eingeschlossen, welche aufgrund des Verdachts auf eine Kollagenose in der Rheumatologie des Universitätsklinikum Bonn vorstellig wurden. Der Untersuchungszeitraum ging vom 1. Juli 2015 bis zum 31. August 2019. Im Rahmen des retrospektiven Studiendesigns erfolgte die Datenakquise mittels systemischen Durchforstens der elektronischen sowie der analogen Patientenakten.

Dabei wurde die Art der rheumatologischen Erkrankung, krankheitstypische Symptome, klinische Zeichen und das Erfüllen der Klassifikationskriterien für Kollagenosen ermittelt. Laborchemische Parameter wie das Vorhandensein und der Titer von ANA, der Anti-DFS70-Antikörper-Status und das Auftreten von krankheitsspezifischen Antikörpern wurden erfasst.

Die Patienten/-innen wurden zudem entsprechend ihrer Kollagenose-Diagnose (systemischer Lupus erythematodes, primäres Sjögren Syndrom, systemische Sklerose, Mischkollagenose, Polymyositis und Dermatomyositis, undifferenzierte Kollagenose) gruppiert und in jedem Fall auf das Erfüllen der Klassifikationskriterien für die jeweilige Kollagenose untersucht. Für den systemische Lupus erythematodes wurden die SLICC 2012 (Petri et al., 2012) und die ACR/EULAR 2019 Kriterien (Aringer et al., 2019), für die systemische Sklerose die ACR/EULAR 2013 Kriterien (van den Hoogen et al., 2013), für das Sjögren Syndrom die ACR/EULAR 2016 (Shiboski et al., 2017) und die Kriterien der American-European Consensus Group (Vitali, 2002), für die Mischkollagenose die Kriterien von Alarcon-Segovia und Villarreal (Kasukawa, 1999) als auch die Kriterien von Kasukawa (Mosca et al., 2008) und Sharp (Sharp et al., 1972) verwendet. Für die Dermatomyositis und Polymyositis wiederum wurden die Klassifikationskriterien von Bohan und Peter (Bohan und Peter, 1975a, 1975b) und Tanimoto et al. (Tanimoto et al., 1995) herangezogen.

Der Goldstandard für das Vorliegen einer Kollagenose war die Diagnose des/der behandelnden Rheumatologen/-in (Mockenhaupt et al., 2022).

Zudem wurden auch Patienten/-innen mit anderen rheumatologischen Erkrankungen auf das Vorhandensein von Anti-DFS70 untersucht. Dazu zählen Patienten/-innen mit rheumatoider Arthritis, Spondyloarthritis, Psoriasis Arthritis, Polymyalgia rheumatica, reaktiver und undifferenzierter Arthritis und Patienten/-innen mit Vaskulitiden.

Eine Begutachtung der Studie erfolgte durch die zuständige lokale Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn (Lfd.Nr.34618). Eine Zustimmung der Patienten/-innen im Sinne einer Einverständniserklärung war aufgrund des retrospektiven Studiendesigns nicht notwendig.

1.2.2 Labordiagnostik

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Kollagenose erfolgte die Labordiagnostik als Stufendiagnostik, wobei zuerst ein IIFT als Screeningtest durchgeführt wurde, um festzustellen, ob ANA vorhanden sind (vgl. Abb.1). Hierfür wurden Mosaic HEp20-10 Objektträger (Euroimmun, Lübeck, Deutschland) und das EURO-Pattern-Mikroskop verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der EURO-LabOffice Software (Euroimmun) durch zwei unabhängige Untersucher. Bei Nachweis von ANA erfolgte eine weitergehende Analyse mit ANA-Differenzierung für den Nachweis von krankheitsrelevanten Autoantikörpern. Dies wurde mittels Line Immunoassay (EUROLINE ANA Profil plus DFS70 (IgG) (Euroimmun)) unter Verwendung des EURO Blot One instrument (Euroimmun) durchgeführt. Beim Line Immunoassay handelt es sich um eine Variante der ELISA-Technik, wobei Antigene auf einem Nylonteststreifen aufgebracht sind. Dieser wird anschließend in verdünntem Serum inkubiert und entwickelt und kann daraufhin gegen einen Referenzstreifen abgelesen werden (Maclachlan et al., 2002).

Der hier verwendete Line Immunoassay detektiert menschliche IgG-Autoantikörper unter anderen gegen nRNP/Sm, Sm, SS-A (Ro, 60 kDa /52 kDa), SS-B (La), Scl-70, PM-Scl, Jo-1, dsDNA, Nukleosomen, Histone, ribosomales P-Protein und DFS70 im Patientenserum (Mockenhaupt et al., 2022).

Es erfolgte ein Kategorisieren der Autoantikörper und von Anti-DFS70 in negativ, grenzwertig, positiv und stark positiv, wobei gemäß Herstellerangaben vorgegangen wurde. Diesen semiquantitativen Deskriptoren wurden folgende Zahlenwerte zugeordnet:

negativ: 0-5, grenzwertig: 6-10, positiv: 11-50, stark positiv: >50 (Mockenhaupt et al., 2022).

Patienten/-innen mit sowohl positivem ANA IIFT als auch positivem Line Immunoassay Anti-DFS70-Ergebnis wurden als "positiv" eingestuft.

Im Fall von grenzwertigen oder widersprüchlichen Ergebnissen zwischen diesen beiden Untersuchungen wurde zusätzlich ein spezifisches Immunoassay mit dem Phadia 250-Analysegerät (Thermo Fisher Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland) oder ELISA mit dem Euroimmun Analyzer I (Euroimmun) zur Bestätigung des nachgewiesenen Autoantikörpers durchgeführt. Die beschriebenen Tests wurden im Zentrallabor der Uniklinik Bonn durchgeführt und erfüllen alle Kriterien der vorgeschriebenen Qualitätskontrollen. Der Ablauf der Labordiagnostik ist nochmals in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Anti-DFS70-Antikörper-Monospezifität wurde definiert als das Vorhandensein von Anti-DFS70-Antikörpern als einzigem rheumatologischem Antikörper.

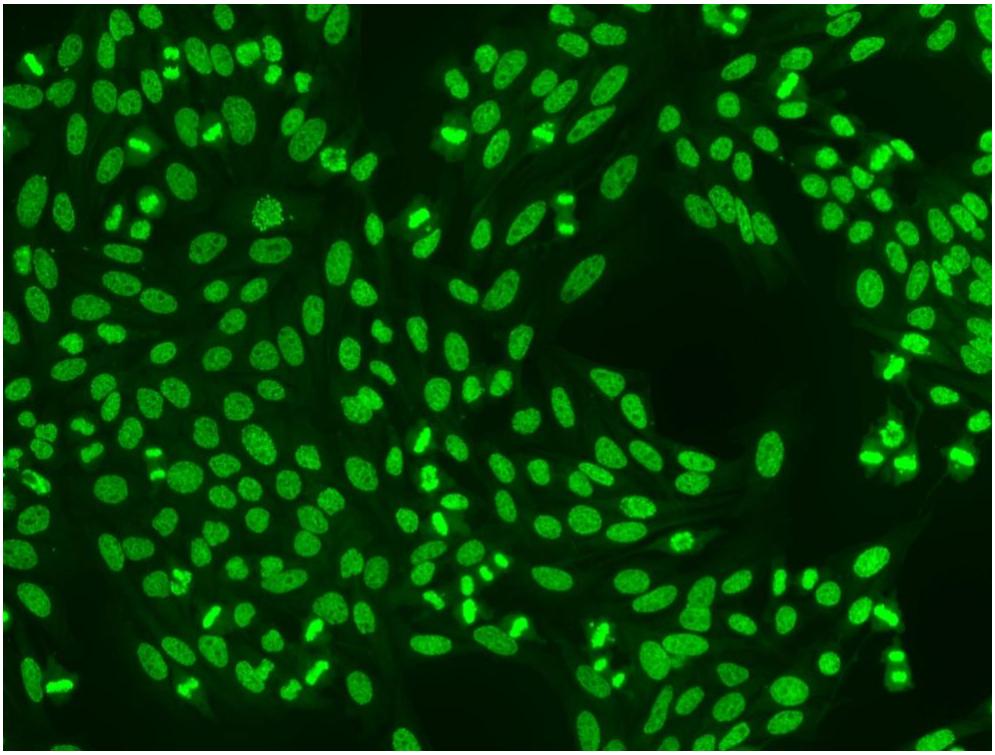

Abb. 1: Das dense fine speckled Muster (DFS70) in der IIF auf Hep-2-Zellen (Quelle: Zentrallabor Uniklinik Bonn, mit Genehmigung von Prof. Stoffel-Wagner)

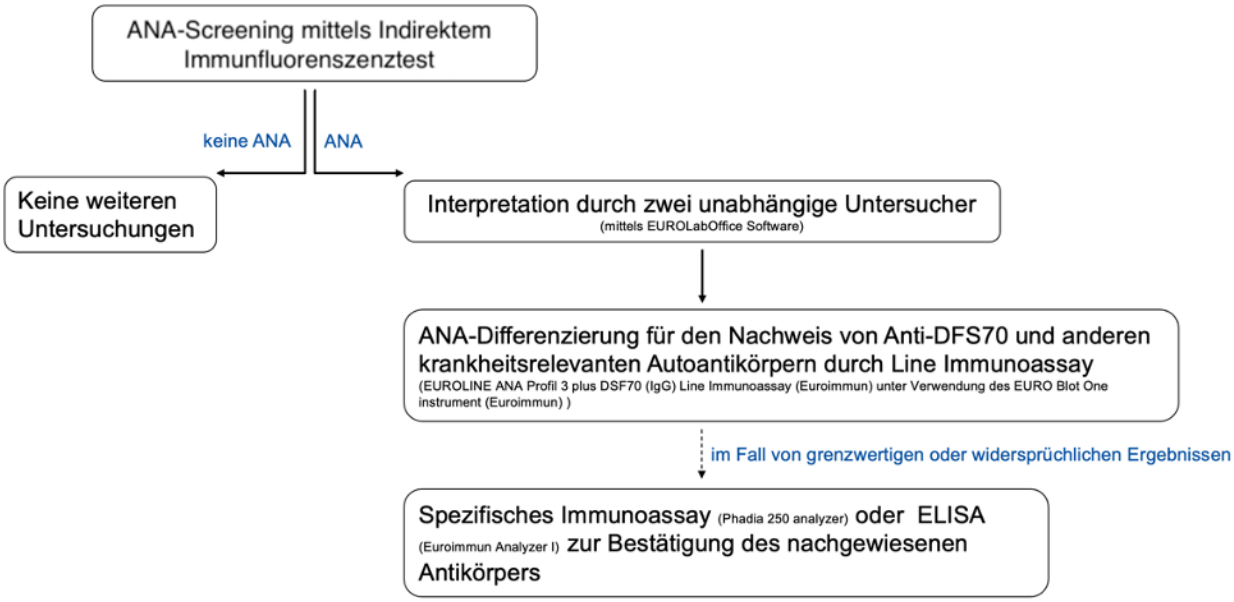

Abb. 2: Ablaufschema der Labordiagnostik (Quelle: eigene Darstellung)

1.2.3 Statistische Analyse

Es wurde eine deskriptive Datenauswertung durchgeführt, wobei für kontinuierliche Daten der Mittelwert und die Standardabweichung und für kategorische Daten sowohl absolute als auch relative Häufigkeiten angegeben wurden. Um Patientengruppen mit kategorischen Variablen miteinander vergleichen zu können, wurde der Chi-Quadrat-Test und der exakte Fisher-Test durchgeführt. Der Vergleich von Gruppen mit kontinuierlichen normalverteilten Variablen erfolgte mittels T-Test. Ein Signifikanzniveau von alpha = 0,05 wurde festgelegt. P-Werte unter 0,05 sind demnach als statistisch signifikant zu werten. Die gesamten statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS, Version 26 (IBM) durchgeführt.

Ziel der Studie war es zudem, eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien, welche Anti-DFS70 untersucht haben, zu erreichen. Daher wurde die Sensitivität als der Anteil der positiven Anti-DFS70-Testergebnisse bei Patienten/-innen ohne Kollagenose und die Spezifität als der Anteil der negativen Anti-DFS70-Testergebnisse bei Patienten/-innen mit Kollagenose definiert.

1.2 Ergebnisse

1.3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 460 Patienten/-innen im Alter von 18 bis 81 Jahren auf das Vorhandensein von Anti-DFS70-Antikörpern untersucht. Der Altersdurchschnitt lag bei 50 Jahren wobei sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen Patienten/-innen mit diagnostizierter Kollagenose (Durchschnittsalter 49,5 Jahre) und Patienten/-innen ohne Kollagenose (Durchschnittsalter 50,5 Jahre) feststellen ließ. Es fällt auf, dass mit 79,5% aller Patienten/-innen eine Mehrheit der untersuchten Patienten/-innen weiblich war (367 Patientinnen).

Bei 182 Patienten/-innen wurde eine Kollagenose diagnostiziert. Dies entspricht 39,6 % aller untersuchten Patienten/-innen. Auch hier ist eine Mehrzahl der Patienten/-innen weiblich (164 Patientinnen, 90,1 %). Bei 96,2 % (175 Patienten/-innen) aller Patienten/-innen mit diagnostizierter Kollagenose wurden ANA-Titer ≥ 1:80 und bei 92,9% ein ANA-Titer ≥ 1:160 detektiert.

Bei 58,7 % der untersuchten Patienten/-innen wurde eine rheumatologische Erkrankung diagnostiziert. Dies entspricht einer Anzahl von 270 Patienten/-innen, wovon bei 182 eine Kollagenose (67,4 % aller Patienten/-innen mit rheumatologischen Erkrankungen) nachgewiesen wurde. Neben den Kollagenosen trat die rheumatoide Arthritis häufig auf. Diese wurde bei 21,5 % aller Patienten/-innen mit rheumatologischen Erkrankungen festgestellt (58 Patienten/-innen, 12,6 % aller Patienten/-innen). Weniger häufig traten eine Psoriasis-Arthritis (14 Patienten/-innen, 3 % aller Patienten/-innen) oder Spondyloarthritiden (8 Patienten/-innen, 1,7 % aller Patienten/-innen) auf. Darüber hinaus wurde bei insgesamt 24 Patienten/-innen ein Overlap-Syndrom festgestellt. Davon wurden bei einem/-er Patienten/-in drei rheumatologische Erkrankungen und bei den restlichen Patienten/-innen zwei Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis diagnostiziert.

Von allen 182 Patienten/-innen mit Kollagenose, litten die meisten mit 39 % unter einem Systemischen Lupus erythematodes (71 Patienten/-innen). Eine undifferenzierte Kollagenose wurde bei 19,8 % (36 Patienten/-innen) aller Kollagenose-Patienten/-innen, ein primäres Sjögren Syndrom bei 32 Patienten/-innen (17,6 %), eine systemische Sklerose bei 12,1 % (22 Patienten/-innen), eine Mischkollagenose bei 11,5 % (21 Patienten/-innen) und eine Polymyositis oder Dermatomyositis bei 6 % (11 Patienten/-innen) diagnostiziert.

Ausführliche Informationen zur Geschlechtsverteilung und der Häufigkeit der unterschiedlichen rheumatologischen Erkrankungen und insbesondere der Kollagenosen lassen sich in Tabelle 1 (Tabelle 1 der Originalpublikation) nachvollziehen.

Tab. 1: Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen rheumatologischen Krankheitsentitäten im ganzen Patienten/-innen-Kollektiv und im Vergleich zwischen den Geschlechtern (Mockenhaupt et al., 2022) (übersetzte Tabelle aus der beigefügten Originalarbeit)

	Weiblich, n=367 (100%)	**Männlich, n=93 (100%)**	**Alle, n=460 (100%)**
Rheumatologische Erkrankung	229 (62,4%)	41 (44,1%)	270 (58,7%)
Kollagenose	164 (44,7)	18 (19,4%)	182 (39,6%)
Systemischer Lupus erythematodes	67 (18,3%)	4 (4,3%)	71 (15,4%)
Systemische Sklerose	16 (4,4%)	6 (6,5%)	22 (4,8%)
Primäres Sjögren Syndrom	31 (8,4%)	1 (1,1%)	32 (7,0%)
Mischkollagenose	19 (5,2%)	2 (2,2%)	21 (4,6%)
Polymyositis/ Dermatomyositis	9 (2,5%)	2 (2,2%)	11 (2,4%)
Undifferenzierte Kollagenose	32 (8,7%)	4 (4,3%)	36 (7,8%)
Andere rheumatologische Erkrankungen			
Rheumatoide Arthritis	49 (13,4%)	9 (9,7%)	58 (12,6%)
Spondyloarthritis	6 (1,6%)	2 (2,2%)	8 (1,7%)
Psoriasis-Arthritis	8 (2,2%)	6 (6,5%)	14 (3,0%)
Polymyalgia rheumatica	1 (0,3%)	3 (3,2%)	4 (0,9%)
Reaktive Arthritis	1 (0,3%)	1 (1,1%)	2 (0,4%)
Enteropathische Arthritis	1 (0,3%)	2 (2,2%)	3 (0,7%)
Undifferenzierte Arthritis	0	1 (1,1%)	1 (0,2%)
Kleingefäßvaskulitis	1 (0,3%)	1 (1,1%)	2 (0,4%)
Großgefäßvaskulitis	4 (1,1%)	1 (1,1%)	5 (1,1%)
Overlap einer Kollagenose mit einer anderen rheumatologischen Erkrankung	20 (5,4%)	4 (4,3%)	24 (5,2%)

1.3.2 Anti-DFS70-Antikörper bei Patienten/-innen mit Kollagenose

219 (81,1%) der 270 Patienten/-innen mit rheumatologischer Erkrankung waren Anti-DFS70 negativ. Weitere 36 Patienten/-innen (13,3 %) waren Anti-DFS70 positiv und 15 Patienten/-innen (5,6 %) hatten ein grenzwertiges Anti-DFS70 Ergebnis.

Von den 36 Anti-DFS70 positiven Patienten/-innen hatten 21 eine Kollagenose. Dies entspricht einem Anteil von 11,5 % aller Kollagenose-Patienten/-innen. Fünf dieser 21 Patienten/-innen wiesen einen systemischen Lupus erythematodes, weitere fünf eine Mischkollagenose, drei ein primäres Sjögren Syndrom, drei eine systemische Sklerose, drei eine undifferenzierte Kollagenose und zwei Patienten/-innen eine Myositis auf.

Anti-DFS70 konnte ebenfalls bei Patienten/-innen mit anderen rheumatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden. 15,5 % (9 Patienten/-innen) aller Patienten/-innen mit rheumatoider Arthritis, zwei Patienten/-innen mit reaktiver Arthritis (100 %) und weitere zwei Patienten/-innen mit Psoriasis-Arthritis (14,3 %) waren Anti-DFS70 positiv.

Die Tabelle 2 (Tabelle 2 der Originalpublikation) veranschaulicht das Auftreten von Anti-DFS70 bei den verschiedenen rheumatologischen Krankheitsentitäten.

Tab. 2: Auftreten des Anti-DFS70-Autoantikörpers (Anti-Dense fine speckled 70-Autoantikörper) bei Kollagenose-Patienten/-innen und bei Patienten/-innen mit anderen rheumatologischen Erkrankungen (Mockenhaupt et al., 2022) (übersetzte Tabelle aus der beigefügten Originalarbeit)

	Alle Patienten/-innen	**Patienten/-innen mit positivem Anti-DFS70 Ergebnis n=81**	**Patienten/-innen mit negativem Anti-DFS70 Ergebnis n=354**	**Patienten/-innen mit grenzwertigem Anti-DFS70 Ergebnis n=25**
Rheumatologische Erkrankung	270 (100 %)	36 (13,3 %)	219 (81,1 %)	15 (5,6 %)
Kollagenose	182 (100 %)	21 (11,5 %)	151 (83,0 %)	10 (5,5 %)
Systemischer Lupus erythematodes	71 (100 %)	5 (7,0 %)	62 (87,3 %)	4 (5,6 %)
Systemische Sklerose	22 (100 %)	3 (13,6 %)	16 (72,7 %)	3 (13,6 %)
Primäres Sjögren Syndrom	32 (100 %)	3 (9,4 %)	28 (87,5 %)	1 (3,1 %)
Mischkollagenose	21 (100 %)	5 (23,8 %)	16 (76,2 %)	0
Myositis	11 (100 %)	2 (18,2 %)	8 (72,7 %)	1 (9,1 %)
Undifferenzierte Kollagenose	36 (100 %)	3 (8,3 %)	31 (86,1 %)	2 (5,6 %)
Andere rheumatologische Erkrankungen				
Rheumatoide Arthritis	58 (100 %)	9 (15,5 %)	45 (77,6 %)	4 (6,9 %)
Spondyloarthritis	8 (100 %)	2 (25,0 %)	6 (75,0 %)	0
Psoriasis-Arthritis	14 (100 %)	2 (14,3 %)	11 (78,6 %)	1 (7,1 %)
Polymyalgia rheumatica	4 (100 %)	0	4 (100 %)	0
Reaktive Arthritis	2 (100 %)	2 (100 %)	0	0
Enteropathische Arthritis	3 (100 %)	0	3 (100 %)	0
Undifferenzierte Arthritis	1 (100 %)	0	1(100 %)	0
Kleingefäß-vaskulitis	2 (100 %)	0	2 (100 %)	0
Großgefäß-vaskulitis	5 (100 %)	0	5 (100 %)	0

1.3.3 Sensitivität und Spezifität des Anti-DFS70-Autoantikörpers

Insgesamt waren 77 % (354 Patienten/-innen) aller untersuchten Patienten/-innen Anti-DFS70 negativ. 17,6 % (81 Patienten/-innen) hatten ein positives oder stark positives Anti-DFS70 Testergebnis und 5,4 % (25 Patienten/-innen) hatten ein grenzwertiges Testergebnis. Bezüglich des Alters konnten keine Unterschiede zwischen Patienten/-innen mit positivem und Patienten/-innen mit negativem Anti-DFS70 Ergebnis festgestellt werden. Das Durchschnittsalter bei Anti-DFS70 positiven Patienten/-innen betrug 48,7 Jahre, während das durchschnittliche Alter bei Anti-DFS70 negativen Patienten/-innen 50,8 Jahre betrug (p-Wert= 0,308). Bei den Anti-DFS70 positiven Patienten/-innen fand sich ebenfalls kein Unterschied in der Geschlechterverteilung. Es wurden zwar bei mehr Frauen Anti-DFS70-Autoantikörper nachgewiesen (66 Patienten/-innen), jedoch wurden auch deutlich mehr Frauen in diese Studie eingeschlossen (367 Patienten/-innen). Im Verhältnis zeigt sich, dass 16,1 % aller Männer und 18,0 % aller Frauen Anti-DFS70 positiv waren.

Mit 151 Patienten/-innen wies eine Mehrzahl der Kollagenose-Patienten/-innen ein negatives Anti-DFS70-Testergebnis auf. Bei weiteren 21 Kollagenose-Patienten/-innen (25,9 % aller DFS70 positiven Patienten/-innen) ließ sich jedoch der Anti-DFS70-Autoantikörper nachweisen. In der Gruppe der Patienten/-innen ohne Kollagenose waren 60 Patienten/-innen Anti-DFS70 positiv (25,9 % aller Anti-DFS70 positiven Patienten/-innen), während 203 Patienten/-innen negativ waren (57,3 % von allen Anti-DFS70 negativen Patienten/-innen).

Bezüglich des Fehlens einer Kollagenose zeigte Anti-DFS70 eine Spezifität von 86,6%, eine Sensitivität von 26,9% und einen positiven prädiktiven Wert von 68,2% bei einem ANA-Titer ≥ 1:160 (Mockenhaupt et al., 2022).

Dabei konnten wir keinen Einfluss des ANA-Titers auf diese Werte feststellen (vgl. Tabelle 3, Tabelle 3 der Originalpublikation).

Tab. 3: Spezifität, Sensitivität und positiv prädiktiver Wert des Anti-DFS70-Autoantikörpers bei unterschiedlichen ANA-Titern (antinukleärer Antikörper-Titer). Patienten/-innen mit grenzwertigem Anti-DFS70 (Anti-Dense fine speckled 70) – Resultat wurden nicht in die Berechnungen eingeschlossen. (Mockenhaupt et al., 2022)(übersetzte Tabelle aus der beigefügten Originalarbeit)

a) ANA-Titer ≥ 1:80		
N=362	*Keine Kollagenose*	*Kollagenose*
Anti-DFS70 positiv	52	21
Anti-DFS70 negativ	145	144
	Sensitivität: 26.4%	Spezifität: 87.3%
Positiver prädiktiver Wert = 71.2%		
b) ANA-Titer ≥ 1:160		
N=326	*Keine Kollagenose*	*Kollagenose*
Anti-DFS70 positiv	45	21
Anti-DFS70 negativ	122	138
	Sensitivität: 26.9%	Spezifität 86.8%
Positiver prädiktiver Wert = 68.2%		
c) ANA-Titer ≥ 1:640		
N=167	*Keine Kollagenose*	*Kollagenose*
Anti-DFS70 positiv	17	14
Anti-DFS70 negativ	48	88
	Sensitivität: 26.2%	Spezifität: 86.3%
Positiver prädiktiver Wert = 54.8%		

1.3.4 Vorkommen von Anti-DFS70-Antikörpern und anderer krankheitsspezifischer Autoantikörper beim Vorliegen einer Kollagenose

Alle 460 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten/-innen wurde mittels Line Immunoassay zudem auf das Vorhandensein von krankheitsspezifischen Antikörpern untersucht.

Beim Vergleich von Patienten/-innen mit Kollagenose und vorhandenen Anti-DFS70-Autoantikörpern mit Kollagenose-Patienten/-innen ohne Anti-DFS70-Autoantikörpern zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens von krankheitsspezifischen Antikörpern (p-Werte > 0,05). Das Auftreten der für die jeweilige Kollagenose typischen Antikörper im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Anti-DFS70 lässt sich in Tabelle 4 (Tabelle 4 der Originalpublikation) nachvollziehen.

Es fällt auf, dass bei nur einem/-er der 21 Kollagenose-Patienten/-innen mit Nachweis des DFS70-Autoantikörpers keine krankheitsspezifischen Autoantikörper detektiert werden konnten. Dies entspricht einem Anteil von nur 4,8 %. Bei den anderen 20 Patienten/-innen konnten die für die jeweilige Kollagenose typischen Antikörper nachgewiesen werden. Welche Antikörper jeweils detektiert wurden geht aus der Ergänzungstabelle 2 der Originalpublikation hervor (Supplementary Table 2).

In 12 (57,1 %) der genannten 21 Fälle wurde neben dem Line Immunoassay zusätzlich ein Immunoassay/ELISA zum Nachweis der krankheitsrelevanten Antikörper durchgeführt. Auch hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den genannten Patientengruppen festgestellt werden (p-Werte > 0,05, vgl. Supplementary Table 1 der Originalpublikation).

Tab. 4: Nachweis krankheitsspezifischer Antikörper (mittels Line Immunoassay) bei Kollagenose-Patienten/-innen im Zusammenhang mit dem Vorkommen und der Abwesenheit des Anti-DFS70-Autoantikörpers
DFS70 = dense fine speckled 70, dsDNA = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure, Sm = Smith, Scl = Sklerodermie, SSA = Sjögren Syndrom A, SSB = Sjögren Syndrom B, nRNP/SM = Ribonukleoprotein/Smith, Jo1 = Histidyl tRNA Synthetase
(Mockenhaupt et al., 2022) (übersetzte Tabelle aus der beigefügten Originalarbeit)

Kollagenose	**Assoziierte Antikörper**	**Kollagenose + Anti-DFS70 positiv**			**Kollagenose + Anti-DFS70 negativ**			**p-Wert**
		Assoziierte Antikörper vorhanden	*Assoziierte Antikörper nicht vorhanden*	*Gesamtzahl der getesteten Patienten/-innen (100%)*	*Assoziierte Antikörper vorhanden*	*Assoziierte Antikörper nicht vorhanden*	*Gesamtzahl der getesteten Patienten/-innen (100%)*	
Systemischer Lupus erythematodes	Anti-dsDNA	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100%)	13 (23,2%)	43 (76,8%)	56 (100%)	0,404
	Anti-Sm	1 (20,0%)	4 (80,0%)	5 (100%)	10 (16,4%)	51 (83,6%)	61 (100%)	0,835
Systemische Sklerose	Anti-Scl-70	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	3 (20,2%)	12 (80,0%)	15 (100%)	0,099
Primäres Sjögren Syndrom	Anti-SSA (Ro52/TRIM2)	3 (100%)	0 (0,0%)	3 (100%)	24 (85,7%)	4 (14,3%)	28 (100%)	0,483
	Anti-SSA (Ro) 60kD	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	25 (89,3%)	3 (10,7%)	28 (100%)	0,267
	Anti-SSB (La)	1 (33,3%)	2 (67,7%)	3 (100%)	10 (40,0%)	15 (60,0%)	25 (100%)	0,823
Mischkollagenose	Anti-nRNP/Sm	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100%)	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15 (100%)	0,292
Polymyositis/ Dermatomyositis	Anti-Jo1	0	2 (100%)	2 (100%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)	0,301

1.3.5 Auftreten klinischer Zeichen und Symptome bei Kollagenose-Patienten bei Vorhandensein und Abwesenheit des Anti-DFS70-Autoantikörpers

Tabelle 5 (Tabelle 5 der Originalpublikation) stellt das Auftreten klinischer Zeichen und Symptome für Kollagenose-Patienten mit Anti-DFS70-Autoantikörper-Nachweis und Patienten ohne Anti-DFS70-Autoantikörper-Nachweis dar. Ohne Anpassung für multiples Testen unterschieden sich das Auftreten von Fatigue und von Ödemen signifikant zwischen den beiden Patientenkollektiven. Fatigue trat bei 46 Kollagenose-Patienten ohne Anti-DFS70-Antikörper-Nachweis (30,5 % aller Kollagenose-Patienten ohne Anti-DFS70-Antikörper) und bei nur einem Patienten (4,8%) mit vorhandenem Anti-DFS70-Autoantikörper (4,8 %) auf (p-Wert 0,016). Gelenkschwellungen und generalisierte Ödeme traten bei drei Kollagenose-Patienten mit vorhandenen Anti-DFS70-Autoantikörpern (14,3 %) und bei vier Kollagenose-Patienten ohne vorhandenen Anti-DFS70-Autoantikörpern (2,6 %) auf (p-Wert= 0,04).

Wir führten eine Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtests durch, um der Alphafehler-Kumulierung entgegenzuwirken. Anschließend zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientenkollektiven mehr. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass es zwischen Kollagenose-Patienten mit und ohne Anti-DFS70-Autoantikörpern keinen Unterschied in Bezug auf das Vorkommen von bestimmten klinischen Zeichen und Symptomen gibt. Welche klinischen Zeichen, Symptome und Komorbiditäten bei den 21 Kollagenose-Patienten mit Anti-DFS70-Autoantikörpern auftreten, geht aus der Ergänzungstabelle 3 (Supplementary Table 3) der Originalpublikation hervor.

Tab. 5: Symptome und klinische Zeichen von Anti-DFS70 (Anti-Dense fine speckled 70) positiven Kollagenose-Patienten/-innen
SLE= systemischer Lupus erythematodes
(Mockenhaupt et al., 2022) (übersetzte Tabelle aus der beigefügten Originalarbeit)

Symptome/ Klinische Zeichen	**Anti-DFS70-positive Kollagenose-Patienten/-innen N=21 (100 %)**	**Anti-DFS70-negative Kollagenose-Patienten/-innen N=151 (100 %)**	**p-Wert**
Symptome			
Arthralgie	12 (57,1 %)	88 (58,3 %)	1,000
Myalgie	8 (38,1 %)	54 (35,8 %)	0,813
Morgensteifigkeit	2 (9,5 %)	23 (15,2 %)	0,742
Photosensitivität	1 (4,8 %)	19 (12,6 %)	0,474
Fatigue	1 (4,8 %)	46 (30,5 %)	0,016*
Anamnestische Gelenkentzündung	0	3 (2,0 %)	1,000
Übelkeit	0	1 (0,7 %)	1,000
Dysphagie	1 (4,8 %)	5 (3,3 %)	0,548
Klinische Zeichen			
Sicca Syndrom	7 (33,3 %)	68 (45,0 %)	0,355
Raynaud Phänomen	8 (38,1 %)	58 (38,4 %)	1,000
Alopezie	0	5 (3,3 %)	1,000
Schmetterlingserythem/ SLE-typische Hautmanifestationen	5 (23,8 %)	30 (19,9 %)	0,772
Puffy fingers	0	9 (6,0 %)	0,603
Gaenslen-Zeichen der Hände positiv	0	3 (2,0 %)	1,000
Gaenslen-Zeichen der Füße positiv	0	1 (0,7 %)	1,000
Sklerodaktylie/ Madonnenfinger	1 (4,8 %)	3 (2,0 %)	0,409
Mikrostomie	1 (4,8 %)	3 (2,0 %)	0,409
Hypomotilität des Ösophagus	1 (4,8 %)	6 (4,0 %)	1,000
Ulzerationen der Fingerspitzen	3 (14,3 %)	11 (7,3 %)	0,272
Haarverlust	0	8 (5,3 %)	0,598
Orale Ulzera	1 (4,8 %)	14 (9,3 %)	0,698
Daktylitis	0	1 (0,7 %)	1,000
Arthritis	5 (23,8 %)	47 (31,1 %)	0,616
Rezidivierende Sialadentitis	0	7 (4,6 %)	0,600
Ödeme	3 (14,3 %)	4 (2,6 %)	0,040*
Gelenkkontrakturen	1 (4,8 %)	6 (4,0 %)	0,864
Sklerosierung der Haut	0	1 (0,7 %)	1,000
Telangiektasien	2 (9,5 %)	7 (4,6 %)	0,302
Positiver Schirmer-Test	2 (9,5 %)	4 (2,6 %)	0,158
Muliple Aborte	0	2 (1,3 %)	1,000
Enthesitis	0	1 (0,7 %)	1,000
Neurologische Veränderungen	0	3 (2,0 %)	1,000
Entzündung der Augen	0	2 (1,3 %)	1,000
Subfebrile Temperaturen	0	2 (1,3 %)	1,000
Fieber	2 (9,5 %)	7 (4,6 %)	0,302
Verkürztes Zungenbändchen	0	1 (0,7 %)	1,000

1.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurde bei 21 (11,5 %) der 182 Patienten/-innen mit Kollagenose der Anti-DFS70-Autoantikörper nachgewiesen, während 151 (83 %) Patienten/-innen ein negatives und 10 Patienten/-innen ein grenzwertiges Ergebnis hatten. Zur Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und des positiven prädiktiven Werts des Anti-DFS70-Autoantikörpers als Ausschlusskriterium für eine Kollagenose wählten wir einen ANA-Titer von ≥ 1:160 als Cut-off. Dies geschah, um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien wie der von Kiefer et al. (2020) zu gewährleisten. Bezüglich dieser Berechnungen ist zu beachten, dass ein Nachweis von Anti-DFS70-Antikörpern und dementsprechend ein positives Testergebnis einen gesunden Menschen definieren soll, während ein positives Testergebnis bei Studien anderer Thematik üblicherweise erkrankte Patienten/-innen repräsentiert. Die Sensitivität entspricht in diesem Fall daher dem Anteil der positiven Anti-DFS70-Testergebnisse bei Patienten/-innen ohne Kollagenose und die Spezifität dem Anteil der negativen Anti-DFS70-Testergebnisse bei Patienten/-innen mit Kollagenose.

Bei dem gewählten ANA-Titer von ≥ 1:160 als Cut-off und dem zusätzlichen Ausschluss aller Patienten/-innen mit grenzwertigem Anti-DFS70-Autoantikörper Ergebnis, zeigten weiterhin 21 (13,2 %) der verbleibenden 159 Patienten/-innen ein positives Testergebnis. Dabei konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Kollagenose-Patienten/-innen mit positivem und Kollagenose-Patienten/-innen mit negativem Anti-DFS70-Testergebnis hinsichtlich Symptome und klinischer Zeichen, sowie dem Vorhandensein krankheitsspezifischer Antikörper feststellen. Eine klinische Unterscheidung zwischen diesen beiden Patientenkollektiven scheint demnach nicht möglich.

Peker et al. (2019) fanden dagegen nur selten Anti-DFS70-Autoantikörper bei gleichzeitigem Vorliegen von Kollagenose-assoziierten Antikörpern. Von ihren 101 Patienten/-innen mit Systemischem Lupus erythematodes wiesen sechs ein positives Anti-DFS70-Testergebnis auf und bei nur wiederum einem dieser sechs Patienten/-innen ließen sich der Anti-dsDNA-Antikörper nachweisen. Nur ein/-e Patient/-in der 71 Patient/-innen mit primärem Sjögren-Syndrom war Anti-DFS70 positiv. In diesem Fall konnte auch der krankheitstypische Anti-SSA(Ro52)-Antikörper nachgewiesen werden.

Muro et al. (2008) kommen zu ähnlichen Resultaten wie unsere Studie bezüglich dem Auftreten von krankheitsspezifischen Antikörpern bei Anti-DFS70-positivem Testergebnis. Sie konnten bei sechs ihrer sieben Anti-DFS70-positiven Lupus-Patient/-innen (85,7 %) Anti-dsDNA-Antikörper feststellen. Bei zweien davon wurden zudem Anti-Sm-Antikörper detektiert. Insgesamt waren demnach 5,6 % der 124 Lupus-Patienten/-innen Anti-DFS70 positiv. In unserer Studie traf dies auf 7,0 % (fünf von 71) zu. Auch sieben der acht (87,5 %) DFS70-positiven Sjögren-Syndrom Patient/-innen wiesen mit Anti-SSA einen krankheitsspezifischen Antikörper auf. Von den 71 untersuchten Patient/-innen mit Sjögren-Syndrom hatten demzufolge 11,3 % ein positives Anti-DFS70-Testergebnis. Auch bei uns kam man mit 9,4 % (drei von 32) auf ein vergleichbares Resultat.

In der Studie von Shovman et al. (2018) wurde hingegen bei nur einem (2,0 %) der 51 Kollagenose-Patient/-innen der Anti-DFS70-Antikörper festgestellt, jedoch konnten auch in diesem Fall krankheitsspezifische Antikörper (Anti-dsDNA- und Anti-Sm-Antikörper bei Systemischem Lupus erythematodes) nachgewiesen werden.

In unserem Patientenkollektiv detektierten wir fünf Anti-DFS70-positive Lupus-Patient/-innen. Bei zwei Patienten/-innen wurden Anti-dsDNA-Antikörper und bei einem/-er weiteren Patient/-in Anti-Sm-Antikörper mittels Line Immunoassay nachgewiesen. Bei insgesamt drei Patienten/-innen wurde zusätzlich ein ELISA durchgeführt, wobei man Anti-dsDNA-Antikörper feststellte. Darunter fanden sich die zwei Patienten/-innen, bei welchen der Nachweis bereits durch das Line Immunoassay erfolgt war. Demnach wurden bei 80 % (hier: vier von fünf Patienten/-innen, bei Muro et al. 85,7 %) der Anti-DFS70-positiven Lupus-Patient/-innen krankheitstypische Antikörper detektiert. Bei all unseren Anti-DFS70-positiven Sjögren-Syndrom Patienten/-innen konnten Anti-SSA-Antikörper nachgewiesen werden (hier 100 %, 3 Patienten/-innen, bei Muro et al. 87,5 %).

Unsere Ergebnisse zeigen auf, dass der Nachweis von Anti-DFS70-Autoantikörpern von nur begrenztem Wert für den Ausschluss einer Kollagenose ist. Auch Kiefer et al. (2020) berichteten über ähnliche Resultate. Ihre Studie fasste eine Gesamtzahl von 270 Patienten/-innen, wobei 91 Patienten/-innen (33,7 %) unter einer Kollagenose litten und der Anti-DFS70-Antikörper mit einer Prävalenz von 7,0 % (19 Patienten/-innen) auftrat. Bei zwei der 19 Anti-DFS70-positiven Patienten/-innen (10,5 % bei ANA ≥ 1:80) wurde

eine Kollagenose diagnostiziert. Leider wurden die Patienten/-innen im Rahmen dieser Studie nicht auf das Vorhandensein krankheitsspezifischer Antikörper und klinische Zeichen und Symptome untersucht, sodass hierzu keine Aussage getroffen werden kann. Die Sensitivität des Anti-DFS70-Autoantikörpers für den Ausschluss einer Kollagenose lag abhängig vom ANA-Titer (≥ 1:80 bzw. ≥ 1:320) bei 10,8 % und 13,3 %. Bei einem ANA-Titer von ≥ 1:640 betrug die Sensitivität 12,2 %.

In unserer Studie wiederum wurde der Anti-DFS70-Antikörper mit einer Prävalenz von 17,6 % (81 von 460 Patienten/-innen) nachgewiesen. Bei einem ANA-Titer ≥ 1:80 stellten wir 21 Kollagenose-Patienten/-innen (28,8 %) unter allen 73 Anti-DFS70-positiven Patienten/-innen fest. Die Sensitivität lag bei einem ANA-Titer von ≥ 1:80 bei 26,4 % und bei einem Titer von ≥ 1:640 bei 26,2 %. Der positiv prädiktive Wert in der Studie von Kiefer et al. variierte abhängig vom ANA-Titer von 85,7 % bis 94,7 % (85,7% für ANA ≥ 1:640 und 94,7% für ANA ≥ 1:320) (Kiefer et al., 2020). Unsere Resultate zeigten positive prädiktive Werte zwischen 54,8% (ANA ≥ 1:640) und 71,2% (ANA ≥ 1:80). Bemerkenswerterweise war in beiden Studien der positive prädiktive Wert, welcher durch die Abwesenheit einer Kollagenose („Gesundheit“) bei positivem Anti-DFS70-Ergebnis definiert wird, bei hohen ANA-Titern (≥ 1:640) am niedrigsten. Ob diese Beobachtung von klinischer Relevanz oder nur reiner Zufall ist, lässt sich aktuell nicht beurteilen und bedarf weiterer Untersuchungen. Insgesamt scheinen diese Werte jedoch zu niedrig zu sein, um eine Kollagenose durch das reine Vorhandensein des Anti-DFS70-Autoantikörpers sicher ausschließen zu können.

Von den 21 in unserer Studie Anti-DFS70 positiven Kollagenose-Patienten/-innen konnte bei nur einem/einer Patienten/-in kein krankheitstypischer Antikörper nachgewiesen werden. Bei den restlichen 20 Patienten/-innen war dies der Fall. Dies entspricht 1,2 % aller Patienten/-innen mit positivem Anti-DFS70-Testergebnis (1 von 81 Patienten/-innen). Daraus könnte man den Schluss ziehen, dass ein monospezifischer Nachweis des Anti-DFS70-Autoantikörpers eine Kollagenose unwahrscheinlich macht.

Auch Infantino et al. (2019) kamen in ihrer Studie zu diesem Fazit. Dort trat eine Kollagenose mit einer Prävalenz von 50 % auf (384 von 768 Patienten/-innen)

und bei sieben Kollagenose-Patienten/-innen wurde der Anti-DFS70-Autoantikörper detektiert. Zusätzlich konnten bei allen sieben Patienten/-innen krankheitsspezifische Anti-ENA (extrahierbare nukleäre Antigen-Antikörper) nachgewiesen werden. Die Autoren postulierten, dass ein kombinierter Ansatz, bestehend aus dem Nachweis des Anti-DFS70-Antikörpers bei ANA-positiven Patienten und dem zusätzlichen Ausschluss von krankheitsspezifischen Antikörpern (Anti-ENA), dem behandelnden Rheumatologen helfen könnte, eine Kollagenose auszuschließen.

Gleichen Schluss zogen auch Choi et al. (2017) in ihrer Analyse über die Prävalenz von Anti-DFS70-Autoantikörpern bei Patienten/-innen mit systemischem Lupus erythematodes. Anti-DFS70-Antikörper-Monospezifität konnte bei nur 1,1 % der Patienten/-innen festgestellt werden. Dies entspricht 13 der insgesamt 1137 Lupus-Patienten/-innen (Choi et al., 2017). Daraus wird erneut die Wichtigkeit einer genauen klinischen Untersuchung des/der Patienten/-in durch den/die behandelnden/-e Rheumatologen/-in und eine Analyse von krankheitsspezifischen Antikörpern bei positivem Anti-DFS70-Testergebnis deutlich.

Eine Studie, welche die klinischen Phänotypen von Patienten/-innen mit positivem Anti-DFS70-Testergebnis untersuchte, stellte, wie auch wir, fest, dass Anti-DFS70-Autoantikörper insgesamt seltener bei Kollagenose-Patienten/-innen auftritt (Miyara et al., 2013). Jedoch betonen auch sie die Wichtigkeit der genauen klinischen Untersuchung und zeigen auf, dass eine Kollagenose nur durch das Vorhandensein des Anti-DFS70-Antikörpers nicht ausgeschlossen werden kann.

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten/-innen wurden bei Verdacht auf eine rheumatologische Grunderkrankung auf das Vorliegen von ANA und Anti-DFS70-Antikörpern untersucht. Dies führt zu einer gewissen Vorselektion und eine damit einhergehender Stichprobenverzerrung. Aufgrund dessen können die Erkenntnisse dieser Studie nicht verallgemeinert werden. Eine Untersuchung auf ANA und Anti-DFS70-Antikörper wird jedoch zumeist im Rahmen einer rheumatologischen Diagnostik durchgeführt. Dementsprechend entspricht unser Patientenkollektiv dem Kollektiv an Patienten/-innen, bei welchem diese Untersuchungen von Bedeutung sind. Der Zusammenhang von Anti-DFS70-Antikörpern und Erkrankungen außerhalb des

rheumatologischen Formenkreises, sowie das Therapiestadium wurde in unserer Studie nur unzureichend untersucht, sodass unklar ist, inwieweit andere Erkrankungen und eine bereits begonnene Therapie das Anti-DFS70-Testergebnis beeinflussen können. Diese Daten konnten aufgrund des retrospektiven Studiendesigns nur ungenügend akquiriert werden. Um die genannten Fragen beantworten zu können, sind weitergehende Untersuchungen, bestenfalls im Rahmen einer prospektiven Studie, vonnöten. Der große Vorteil dieser Studie besteht in einem großen Patientenkollektiv von 460 Patienten/-innen und darin, dass neben dem Anti-DFS70-Autantikörper weitere krankheitsspezifische Antikörper untersucht wurden. Zudem wurden die klinischen Zeichen und Symptome zwischen Patienten/-innen mit und ohne vorhandenen Anti-DFS70-Autoantikörper verglichen. Unseres Wissens ist dies die erste Studie ihrer Art, in welcher gleichzeitig all diese verschiedenen Aspekte begutachtet wurden.

1.5 Zusammenfassung

Eine Untersuchung auf ANA erfolgt in der Regel bei Verdacht auf eine rheumatologische Grunderkrankung und insbesondere bei Verdacht auf das Vorliegen einer Kollagenose (Mahler und Fritzler, 2010). Diese ANA werden durch einen IIFT auf menschlichen Epithelzellen (Hep-2-Zellen) nachgewiesen (Mahler und Fritzler, 2012). Es wurde jedoch festgestellt, dass sich ANA auch häufig bei gesunden Personen nachweisen lassen (Mahler et al., 2012). In diesen Fällen richtet sich die Mehrheit der ANA gegen das DFS70-Antigen.

Der Begriff DFS70 leitet sich aus dem spezifischen dichten, fein gesprenkelten Muster im IIFT und seinem Antigen mit einem Molekulargewicht von 70 kDa im Line-Immunoassey ab (Infantino et al., 2019). Da der Anti-DFS70-Antikörper seltener bei Patienten/-innen mit Kollagenosen festgestellt wurde, wird dieser als Ausschlusskriterium für eine Kollagenose bei Nachweis von ANA (Mahler et al., 2012).

Unsere Studie zeigt, dass der reine Nachweis des Anti-DFS70-Autoantikörpers eine Kollagenose nicht sicher ausschließen kann. Bei 21 der 182 Kollagenose-Patienten (11,5 %) konnte der Anti-DFS70-Antikörper nachgewiesen werden. Damit hatten 25,9 % aller

Anti-DFS70-positiven Patienten/-innen eine Kollagenose. Hierbei konnte zudem kein Unterschied bezüglich Alter, Geschlechterverteilung, klinischer Zeichen und Symptome und dem Vorhandensein krankheitsspezifischer Antikörper zwischen Anti-DFS70-negativen und Anti-DFS70-positiven Kollagenose-Patienten/-innen festgestellt werden. Eine klinische Unterscheidung dieser beiden Patientengruppen ist demnach nicht möglich. Die Sensitivität des Anti-DFS70-Antikörpers zum Ausschluss einer Kollagenose lag abhängig vom ANA-Titer zwischen 26,2 % (ANA ≥ 1:640 und 26,9% (ANA ≥ 1:160). Der positiv prädiktive Wert, welcher durch die Abwesenheit einer Kollagenose („Gesundheit“) bei positivem Anti-DFS70-Ergebnis definiert wird, variierte abhängig vom ANA-Titer zwischen 54,8 % (ANA ≥ 1:640) und 71,2% (ANA ≥ 1:80), wobei sich interessanterweise die niedrigsten Werte bei höheren ANA-Titern feststellen ließen.

Wir stellten zudem fest, dass bei nur einem der 21 DFS70-positiven Kollagenose-Patienten/-innen keine krankheitsspezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten. In den anderen 20 Fällen wurden diese detektiert. Dies entspricht 1,2 % aller Anti-DFS70-positiven Patienten/-innen. Da nur 4,8 % aller Kollagenose-Patienten/-innen eine Anti-DFS70-Antikörper-Monospezifität aufwiesen, schließen wir uns dem Vorschlag von Infantino et al. (Infantino et al., 2019) an. Demzufolge sollte auf einen positiven ANA-IIF-Test ein weiterer Test zum Nachweis spezifischer Anti-ENA folgen. Sollten ENAs nachgewiesen werden, müssen die Patienten/-innen weiterhin auf das Vorhandensein einer Kollagenose untersucht werden. Wenn keine ENAs, also keine Kollagenose-typischen Antikörper, detektiert werden und das Fluoreszenzmuster im IIFT typisch für Anti-DFS70 ist, sollte der Test auf den Anti-DFS70-Autoantikörper mittels einem antigenspezifischen Testverfahren bestätigt werden. Hierfür eignet sich ein Line Immunoassay oder ELISA.

Bei Patienten/-innen mit Anti-DFS70-Antikörper-Monospezifität scheint die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Kollagenose gering zu sein, sodass andere Erkrankungen als Ursache ihrer Symptome in Betracht gezogen werden sollten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der reine Nachweis des Anti-DFS70-Autoantikörpers, ohne weitere Analyse Kollagenose-typischer Antikörper, eine Kollagenose nicht sicher ausschließen kann. Jedoch könnte insbesondere das monospezifische Vorliegen des Anti-DFS70-Autoantikörpers richtungsweisend für den

behandelnden Rheumatologen sein und die klinische Diagnostik insgesamt beschleunigen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Altiok E, Bätge B, Böll B, …, Wellhöner P. Basislehrbuch Innere Medizin. 6. Aufl. München: Elsevier, 2018

Aringer M, Costenbader KH, Daikh DI, …, Johnson SR. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheumatol 2019; 71(9): 1400–1412

Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis — (First of Two Parts). N Engl J Med 1975a; 292(7): 344–347

Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis — (Second of Two Parts). N Engl J Med 1975b; 292(8): 403–407

Choi MY, Clarke AE, St Pierre Y, …, Fritzler MJ. The prevalence and determinants of anti-DFS70 autoantibodies in an international inception cohort of systemic lupus erythematosus patients. Lupus 2017; 26(10): 1051–1059

Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. Lancet 2013; 382(9894): 797–808

Infantino M, Pregnolato F, Bentow C, …, Manfredi M. Only monospecific anti-DFS70 antibodies aid in the exclusion of antinuclear antibody associated rheumatic diseases: an Italian experience. Clin Chem Lab Med 2019; 57(11): 1764–1769

Kasukawa R. Mixed Connective Tissue Disease. Intern Med 1999; 38(5): 386–393

Kiefer D, von Brunn M, Baraliakos X, Andreica I, Braun J. Klinische Wertigkeit der Bestimmung von DFS70-Antikörpern für den Ausschluss von Kollagenosen. Z Rheumatol 2020; 79(8): 749–754

Maclachlan D, Vogt P, Wu X, Rose L, Tyndall A, Hasler P. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) mittels Line Immunoassay (LIA) im Vergleich mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Relation zu anderen Laborparametern und zur Klinik. Z Rheumatol 2002; 61(5): 534–544

Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases: Epitope specificity. Ann N Y Acad Sci 2010; 1183(1): 267–287

Mahler M, Fritzler MJ. The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases. Clin Dev Immunol 2012; 2012: 494356

Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2012; 11(9): 642–645

Miyara M, Albesa R, Charuel JL, El Amri M, Fritzler MJ, Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Musset L, Mahler M. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. Clin Dev Immunol 2013; 2013: 703759

Mockenhaupt LM, Dolscheid-Pommerich R, Stoffel-Wagner B, Behning C, Brossart P, Schäfer VS. Autoantibodies to dense-fine-speckled 70 (DFS70) do not necessarily rule out connective tissue diseases. Semin Arthritis Rheum 2022; 52: 151936

Mosca M, Talarico R, Bombardieri S. Mixed Connective Tissue Disease. In: Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, Hrsg. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. Totowa: Humana Press, 2008: 43–46

Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody–positive patients with autoimmune rheumatic disease. Lupus 2008; 17(3): 171–176

Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EKL, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(6): 1211–1220

O'Rourke DJ, DiJohnson DA, Caiazzo RJ, Nelson JC, Ure D, O'Leary MP, Richie JP, Liu BC-S. Autoantibody Signatures as Biomarkers to Distinguish Prostate Cancer from Benign Prostatic Hyperplasia in Patients with Increased Serum Prostate Specific Antigen. Clin Chim Acta 2012; 413(5–6): 561–567

Peker BO, Şener AG, Tarhan EF, Kaya S. Investigation of anti-DFS70 antibody in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. Clin Rheumatol 2019; 38(12): 3627–3633

Pepmueller PH. Undifferentiated Connective Tissue Disease, Mixed Connective Tissue Disease, and Overlap Syndromes in Rheumatology. Mo Med 2016; 113(2): 136–140

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, …, Magder LS. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012; 64(8): 2677–2686

Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med 1972; 52(2): 148–159

Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, …, Wu A. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. Arthritis Rheumatol 2017; 69(1): 35–45

Shovman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, Guy A, Perez D, Azoulay D, Blank M, Segal Y, Bentow C, Mahler M, Shoenfeld Y. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. Clin Exp Rheumatol 2018; 36(1): 121–126

Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, Sato T, Kiuchi T, Ohashi Y. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 1995; 22(4): 668–674

van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, …, Pope JE. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis 2013; 72(11): 1747–1755

Vitali C. Classification criteria for Sjogren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002; 61(6): 554–558

Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y, Tomita Y, Muro Y. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. Arthritis Rheum 2004; 50(3): 892–900

Wei Q, Jiang Y, Xie J, Lv Q, Xie Y, Tu L, Xiao M, Wu Z, Gu J. Analysis of antinuclear antibody titers and patterns by using HEp-2 and primate liver tissue substrate indirect immunofluorescence assay in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. J Clin Lab Anal 2020; 34(12): e23546

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Mockenhaupt LM, Dolscheid-Pommerich R, Stoffel-Wagner B, Behning C, Brossart P, Schäfer VS. Autoantibodies to dense-fine-speckled 70 (DFS70) do not necessarily rule out connective tissue diseases. Semin Arthritis Rheum 2022; 52: 151936

https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2021.12.006

3. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Bonn unter Betreuung von Prof. Dr. med. Valentin Schäfer durchgeführt.

Die Publikation, auf die sich diese Arbeit bezieht, wurde in geteilter Erstautorinnenschaft mit Priv.-Doz. Dr. med. Ramona Dolscheid-Pommerich veröffentlicht. Weitere Co-Autoren/-innen der Studie sind Prof. Dr. med. Birgit Stoffel-Wagner, Charlotte Behning, Prof. Dr. med. Peter Brossart und Prof. Dr. med. Valentin Schäfer. Von letzterem stammt auch die grundlegende Idee für die Studie.

Im Rahmen der Studienplanung übernahm ich die Literaturrecherche, die Festlegung der zu erhebenden Daten sowie die Formulierung der dieser Studie zugrunde liegenden Fragestellungen.

Es handelt sich um ein retrospektives Studiendesign und die Labordiagnostik erfolgte zuvor im Zentrallabor der Uniklinik Bonn. Die Ergebnisse der Antikörperdiagnostik wurden mir freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. med. Ramona Dolscheid-Pommerich und Prof. Dr. med. Birgit Stoffel-Wagner zur Verfügung gestellt.

Meine weiteren Verantwortlichkeiten innerhalb dieser Studie umfassten die eigenständige Datenakquise durch die Durchsicht aller digitalen und analogen Patientenakten sowie die Überprüfung, ob die Patienten/-innen die Klassifikationskriterien für die jeweilige Kollagenose erfüllten. Die Daten wurden von mir in Excel aufbereitet und die anschließende statistische Analyse mit SPSS erfolgte ebenfalls eigenständig. Beratend wirkte hierbei Charlotte Behning vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) der Universität Bonn mit.

Alle grafischen Darstellungen in der Dissertationsschrift und in der Publikation habe ich eigenständig erstellt. Ich übernahm zudem die Interpretation der Ergebnisse sowie die Erstellung des Erstmanuskripts der Publikation. Dieses wurde im weiteren Verlauf gemeinsam mit den Co-Autoren/-innen überarbeitet.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf diesem Weg unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Valentin S. Schäfer bedanken, welcher mich während dieser Arbeit betreut hat und ohne den diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Auch gilt mein Dank Frau Dr. med. Ramona Dolscheid-Pommerich und Frau Prof. Dr. med. Birgit Stoffel-Wagner, welche die Antikörperdiagnostik durchgeführt haben und mir bei laborchemischen Fragen zur Seite standen.

Herrn Professor Dr. med. Peter Brossart, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III für Onkologie, Hämatologie, Immunonkologie und Rheumatologie des Universitätsklinikum Bonn danke ich ebenfalls, sowie Frau Charlotte Behning, welche mich hinsichtlich statistischer Fragen beraten und unterstützt hat.

Ein abschließender Dank geht an meine Eltern, meine Schwester und meinen Ehemann Philip, welche mir bei meinem Studium und dieser Doktorarbeit stetig unterstützend zur Seite gestanden haben.

5. Publikation (PDF-Version)

Seminars in Arthritis and Rheumatism 52 (2022) 151936

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Arthritis and Rheumatism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semarthrit

Autoantibodies to dense-fine-speckled 70 (DFS70) do not necessarily rule out connective tissue diseases

Louisa-Marie Mockenhaupt[a,1], Ramona Dolscheid-Pommerich[b,1], Birgit Stoffel-Wagner[b], Charlotte Behning[c], Peter Brossart[a], Valentin S. Schäfer[a,*]

[a] Clinic of Internal Medicine III, Department of Oncology, Hematology, Rheumatology and Clinical Immunology, University Hospital Bonn, Venusberg Campus 1, Bonn 53127, Germany
[b] Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Germany
[c] Institute of Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, University Hospital Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Dense-fine-speckled 70
Antinuclear antibodies
Connective tissue disease
Systemic lupus erythematosus
Mixed connective tissue diseases
Primary Sjögren's syndrome

ABSTRACT

Objectives: In some patients with antinuclear antibodies (ANA), a pattern called anti-dense-fine-speckled-70 antibody (anti-DFS70) can be detected. Presence of anti-DFS70 is less frequently observed in patients with connective tissue diseases (CTD) and is therefore used as an exclusion criterion by some rheumatologists. To date, however, it is unclear as to what extent the presence of an anti-DFS70 can reliably rule out CTDs.
Methods: Data of 460 patients who were tested for the presence of anti-DFS70 at University Hospital Bonn, Germany, were analyzed. Patients were examined with regard to clinical symptoms and signs, type of disease, type of CTD, fulfillment of the classification criteria, presence of anti-DFS70, other systemic autoantibodies and ANA titers by indirect immunofluorescence (IIF) assays and line immunoassays. Differences in DFS70 antibody status between patients with CTD were examined. In addition, specificity, sensitivity, and positive predictive values for different ANA titers were calculated.
Results: In 182 of the 460 patients (of whom 79.8% were female), CTD was diagnosed. 354 patients (77.0%) tested negative, 81 (17.6%) positive and 25 (5.4%) borderline for anti-DFS70. Twenty-one patients (25.9%) with a positive result had CTD. No significant differences were observed between anti-DFS70 positive and anti-DFS70 negative patients with CTD concerning age, gender, symptoms, clinical signs, and other disease-specific antibodies. However, of these 21 patients, only one patient showed the monospecific appearance of anti-DFS70. Anti-DFS70 had a sensitivity and a specificity of 26.9% and 86.8%, respectively, with a positive predictive value of 68.2% at an ANA titer of ≥1:160 with respect to the absence of CTD.
Conclusions: Autoantibodies to DFS70 seem to be prevalent in CTD patients and are thus not a good exclusion criterion. The monospecific occurrence of anti-DFS70 can, however, be helpful in ambiguous situations.
© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Antinuclear antibodies (ANA) are serological markers for the presence of systemic autoimmune diseases [1] and are usually detected by indirect immunofluorescence (IIF) assay on Hep-2 cells [2]. However, the presence of ANA can also be detected in up to 20% of healthy individuals [3]. One reason is the presence of anti-dense-fine-speckled-70 antibodies [3].

The term DFS70 evolved from the specific dense fine speckled pattern in IIF and its antigen with a molecular weight of 70 kDa in line immunoassay [4]. Anti-DFS70 antibodies were first described in a patient with interstitial cystitis [5] and have subsequently been found in many other diseases, such as atopic dermatitis [6], chronic inflammatory diseases and cancer [7], and also in healthy individuals [8].

As it has been reported that anti-DFS70 antibodies occur less frequently in patients with connective tissue disease (CTD), this antibody is used by some rheumatologists as an exclusion criterion for a CTD in the presence of an ANA titer [3].

CTDs comprise a group of systemic autoimmune diseases which include systemic lupus erythematosus (SLE), primary Sjögren's syndrome (pSS), systemic sclerosis (SSc), mixed connective tissue diseases (MCTD), polymyositis (PM), dermatomyositis (DM) and undifferentiated connective tissue diseases (UCTD).

Abbreviations: DFS70, dense-fine-speckled 70; SLE, systemic lupus erythematosus; CTD, connective tissue disease; MCTD, mixed connective tissue diseases; ANA, antinuclear antibodies

* Corresponding author.
E-mail addresses: louisa.mockenhaupt@gmx.de (L.-M. Mockenhaupt), valentin.s.schaefer@hotmail.de (V.S. Schäfer).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2021.12.006
0049-0172/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

These diseases are often unspecific at the beginning and show a large number of different signs and symptoms, making a diagnosis sometimes difficult [9].

ANAs are also observed in up to 54% of healthy individuals [10]. To date, however, it is not clear as to what extent the presence of anti-DFS70 may rule out CTD.

In our clinic, an ANA IIF assay is requested when CTD is suspected. If ANAs are detected, a line immunoassay is carried out for specific ANA differentiation to detect the disease-relevant autoantibodies. This line immunoassay includes the disease-relevant autoantibodies and anti-DFS70.

The aim of our study was to investigate the clinical significance of anti-DFS70 and whether the presence of anti-DFS70 antibodies can exclude CTDs.

To our knowledge, this is the first study comparing ANA titers and symptoms, clinical signs, fulfillment of the classification criteria for the corresponding CTD and the presence of other specific systemic antibodies in CTD patients with and without presence of anti-DFS70 antibodies in a large cohort. In addition, we investigated whether anti-DFS70 also occur in rheumatic diseases other than CTD.

Material and methods

Patients

In this single-center study, anti-DFS70 results of 460 patients (18–81 years old) with suspected ANA-associated systemic autoimmune diseases were investigated. Patients attended the Department of Rheumatology and Clinical Immunology of the University Hospital Bonn, Germany between July 1st, 2015 and August 31st, 2019.

Disease related characteristics, typical clinical symptoms and signs, type of rheumatic disease, type of CTD, fulfillment of CTD classification criteria, presence and titer of ANA, occurrence of disease-specific antibodies, C-reactive protein and anti-DFS70 antibody status were recorded. Patients were grouped according to their CTD diagnosis in SLE, SSc, MCTD, DM/ PM, pSS and UCTD.

The classification criteria for CTD were checked for SSc (ACR/EULAR 2013 [11]), SLE (SLICC 2012 [12], EULAR/ACR 2019 [13]), SS (ACR/EULAR 2016 [14], American-European Consensus Group [15]), MCTD (Alarcon-Segovia and Villarreal [16], Kasukawa [17], Sharp [18]) and for DM and PM (Bohan and Peter [19,20], Tanimoto et al. [21]).

Gold standard for presence of a CTD was the diagnosis of the treating board-certified rheumatologist.

Patients with other rheumatic diseases were also evaluated for the presence of anti-DFS70. These included patients with rheumatoid arthritis, spondylarthritis, psoriatic arthritis, polymyalgia rheumatica, reactive arthritis, enteropathic arthritis, undifferentiated arthritis, small vessel vasculitis and large vessel vasculitis.

Laboratory analysis

Laboratory diagnostics in the case of suspected CTD were carried out systematically in the central laboratory of the University Hospital Bonn as part of a step-by-step diagnosis. An ANA IIF assay using Mosaic HEp20–10 slides (Euroimmun, Luebeck, Germany) with the EURO Pattern microscope was performed initially to determine whether ANAs are present. Interpretation was done using the EURO-LabOffice software (Euroimmun) by two independent investigators. Positive results were further analyzed according to the diagnostic algorithm. Specific ANA differentiation for the simultaneous detection of disease-relevant autoantibodies was performed by line immunoassay with the EURO Blot One instrument (Euroimmun) using the EUROLINE ANA Profil 3 plus DFS70 (IgG) line immunoassay (Euroimmun).

This line immunoassay determines human IgG autoantibodies against nRNP/Sm, Sm, SS-A (Ro, 60 kDa /52 kDa), SS-B (La), Scl-70, PM-SCL, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleosomes, histones, ribosomal P protein, AMA-M2 and DFS70 in patient serum. The line immunoassay uses recombinant DFS70 (full length, human cDNA expressed in mammalian cells). The autoantibodies and anti-DFS70 were categorized as negative, borderline, positive, and strongly positive. According to the manufacturer's instructions, the following numerical readouts were assigned to these semi-quantitative descriptors: negative: 0–5, borderline: 6–10, positive: 11–50 and strongly positive: > 50. Patients with both positive ANA IIF and line immunoassay anti-DFS70 results were classified as "positive".

This procedure was supplemented by a specific immunoassay with the Phadia 250 analyzer (Thermo Fisher Diagnostics GmbH, Freiburg, Germany) or ELISA with the Euroimmun Analyzer I (Euroimmun) to confirm the detected autoantibody if deemed necessary, e.g. in the case of borderline or contradicting results between the ANA IIF assay and the line immunoassay.

Anti-DFS70 antibody monospecificity was defined as the existence of anti-DFS70 antibodies as the sole rheumatological autoantibody. All tests were performed in accordance with the guidelines of the German Medical Association (RiliBÄK) and met all criteria for stipulated internal and external quality controls.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS version 26 (IBM). Descriptive data evaluation was carried out. For categorical variables, absolute and relative frequencies are shown. For continuous data, mean and standard deviation are shown. Comparison between groups with categorical variables was assessed by Chi-square test and Fisher's exact test. Group differences of continuous normally distributed variables were examined by the T-test. P-values shown in Tables are not corrected for multiple testing and p-values below 0.05 were considered statistically significant.

To achieve comparability with other studies investigating anti-DFS70, we defined sensitivity as the proportion of positive anti-DFS70 test results in patients without CTD and specificity as the proportion of negative anti-DFS70 test results in patients with CTD [21]. Borderline patients were excluded from analysis for specificity and sensitivity.

The study was conducted according to Good Clinical Practice (GCP) guidelines and was approved by the respective local medical ethical committee (Lfd.Nr.34618), Chairman K. Racké, MD, PhD, Professor, University Hospital Bonn, Germany.

Results

Patient characteristics

460 patients (367 (79.8%) female and 93 (20.2%) male) were analyzed for the presence of anti-DFS-70 antibodies. Mean age was 50 years (±SD 16.1 years). Patients with CTD were 18 to 81 years old. There were no significant differences concerning age between patients with CTD (mean age 49.5 years) and patients without CTD (mean age 50.5 years, p-value = 0.552).

In 182 patients (164 (90.1%) females and 18 (9.9%) males), CTD was diagnosed.

ANA titers ≥ 1:80 were observed in 175 patients (96.2% of all patients with CTD) with CTD, while ANA titer ≥ 1:160 were observed in 169 (92.9% of all patients with CTD) patients with present CTD.

Demographic data and type of connective tissue and rheumatic disease are listed in Table 1.

All in all, 270 (58.7%) of the 460 patients suffered from a rheumatic disease, while 182 (39.6% of all patients) were diagnosed with CTD. Among all CTDs, SLE was the most common CTD with 71

patients (39.0%). UCTD was diagnosed in 36 (19.8%), pSS in 32 (17.6%), SSc in 22 (12.1%), MCTD in 21 (11.5%), and myositis in 11 (6.0%) of the examined CTD patients.

In addition, rheumatoid arthritis was detected in 58 patients. This corresponds to 12.6% of all patients and 21.5% of all patients with a rheumatic disease. Psoriatic arthritis was found in 14 patients (3.0% of all patients). The occurrence of other rheumatic diseases and the sex distribution are displayed in Table 1.

A total of 24 patients was diagnosed with an overlap syndrome. Of these, 24 of the patients showed two rheumatic diseases, while one patient was diagnosed with three rheumatic diseases.

Occurrence of anti-DFS70 antibodies in CTD patients and patients with other rheumatic diseases

Of the 270 patients with a rheumatic disease, 219 (81.1%) were anti-DFS70 negative, while 36 (13.3%) were positive and 15 (5.6%) patients had a borderline anti-DFS70 result. Of the 36 anti-DFS70 positive patients with a present rheumatic disease, 21 (25.9%) had CTD (five MCTD, five SLE, three UCTD, three SSc, three SS and two myositis).

All of the 21 anti-DFS70 antibody positive CTD patients displayed elevated ANA titers between 1:320 and 1:20,480.

In addition, we also detected anti-DFS70 antibodies in patients with other rheumatic diseases. Nine of the 58 patients (15.5%) with rheumatoid arthritis, two (14.3% of all patients with psoriatic arthritis) with psoriatic arthritis and two of two patients with reactive arthritis were anti-DFS70 positive.

The occurrence of anti-DFS70 antibodies in CTD patients and patients with other rheumatic diseases can be seen for the individual diseases in Table 2.

Sensitivity, specificity and positive predictive value of the anti-DFS70 antibody

354 patients (77% of all patients) were anti-DFS70 negative, 81 (17.6%) positive or strongly positive and 25 (5.4%) had a borderline anti-DFS70 antibody result.

There was no sex difference in anti-DFS70 positive patients (16.1% males and 18.0% females). In terms of age, there was no significant difference between anti-DFS70 positive and anti-DFS70 negative patients (mean: DFS70 positive: 48.7 years, DFS70 negative: 50.8 years, p-value= 0.308). Although 151 CTD patients tested negative for anti-DFS70, 21 (25.9% of all DFS70 positive patients) tested positive. Furthermore, 60 patients without CTD were anti-DFS70 positive and 203 (57.3% of all DFS70 negative patients) negative.

With regard to the absence of CTD, anti-DFS70 showed a specificity of 86.6%, a sensitivity of 26.9%, with a positive predictive value of 68.2% at an ANA titer $\geq$ 1:160.

We did not identify any effect of the ANA titer on these values (Table 3).

Specific systemic antibodies in patients with present CTD and occurrence of anti-DFS70 antibodies

All 460 patients in this study were tested for disease-specific autoantibodies by line immunoassay.

When comparing patients with CTD and present anti-DFS70 antibodies to the control group with CTD and absent anti-DFS70 antibodies, no statistically significant differences were found in the occurrence of disease-specific autoantibodies (p-value $>$ 0.05, cf. Table 4).

In addition, 12 (57.1%) of the 21 patients with DFS70 autoantibody present were tested for the presence of disease-specific antibody by immunoassay/ELISA. There were also no differences detected between the two groups in this matter (p-value $>$ 0.05, cf. Supplementary Table 1).

However, only one of the 21 individuals tested negative for other antibodies (4.8 percent). Table 2 in the Supplemental Material (Supplementary Table 2) shows the additional antibodies detected in the remaining 20 patients in addition to the DFS70 autoantibody.

Clinical signs and symptoms in CTD patients with and without present anti-DFS70 antibodies

Without adjusting for multiple testing, fatigue and edema differed significantly between anti-DFS70 positive and anti-DFS70 negative CTD patients.

Fatigue occurred in 46 patients (30.5% of all patients with CTD present and without anti-DFS70) without anti-DFS70 present and in only one patient (4.8%) with anti-DFS70 present (p-value = 0.016).

Edema of the joints or even generalized edema occurred in three (14.3%) CTD patients with present anti-DFS70 and in four (2.6%) CTD patients without anti-DFS70 (p-value = 0.040).

However, after performing Bonferroni correction for multiple testing, no statistically significant differences were detected between the two groups. As a result, it may be assumed that there are no

Table 1
Demographic data and type of rheumatic disease.

	Female, n = 367 (100%)	Male, n = 93 (100%)	All, n = 460 (100%)
Rheumatic diseases	229 (62.4%)	41 (44.1%)	270 (58.7%)
Connective tissue diseases	164 (44.7)	18 (19.4%)	182 (39.6%)
Systemic lupus erythematosus	67 (18.3%)	4 (4.3%)	71 (15.4%)
Systemic sclerosis	16 (4.4%)	6 (6.5%)	22 (4.8%)
Primary Sjögren's syndrome	31 (8.4%)	1 (1.1%)	32 (7.0%)
Mixed CTD	19 (5.2%)	2 (2.2%)	21 (4.6%)
Polymyositis/dermatomyositis	9 (2.5%)	2 (2.2%)	11 (2.4%)
Undifferentiated CTD	32 (8.7%)	4 (4.3%)	36 (7.8%)
Other rheumatic diseases			
Rheumatoid arthritis	49 (13.4%)	9 (9.7%)	58 (12.6%)
Spondylarthritis	6 (1.6%)	2 (2.2%)	8 (1.7%)
Psoriatic arthritis	8 (2.2%)	6 (6.5%)	14 (3.0%)
Polymyalgia rheumatica	1 (0.3%)	3 (3.2%)	4 (0.9%)
Reactive arthritis	1 (0.3%)	1 (1.1%)	2 (0.4%)
Enteropathic arthritis	1 (0.3%)	2 (2.2%)	3 (0.7%)
Undifferentiated arthritis	0	1 (1.1%)	1 (0.2%)
Small vessel vasculitis	1 (0.3%)	1 (1.1%)	2 (0.4%)
Large vessel vasculitis	4 (1.1%)	1 (1.1%)	5 (1.1%)
Overlap CTD with other rheumatic disease	20 (5.4%)	4 (4.3%)	24 (5.2%)

CTD = connective tissue disease.

Table 2
Occurrence of anti-DFS70 antibodies in CTD patients and patients with other rheumatic diseases.

	All patients	Anti-DFS70 positive patients *n* = 81	Anti-DFS70 negative patients *n* = 354	Borderline anti-DFS70 patients *n* = 25
Rheumatic disease	270 (100%)	36 (13.3%)	219 (81.1%)	15 (5.6%)
Connective tissue diseases	182 (100%)	21 (11.5%)	151 (83.0%)	10 (5.5%)
Systemic lupus erythematosus	71 (100%)	5 (7.0%)	62 (87.3%)	4 (5.6%)
Systemic sclerosis	22 (100%)	3 (13.6%)	16 (72.7%)	3 (13.6%)
Primary Sjögren's syndrome	32 (100%)	3 (9.4%)	28 (87.5%)	1 (3.1%)
MCTD	21 (100%)	5 (23.8%)	16 (76.2%)	0
Myositis	11 (100%)	2 (18.2%)	8 (72.7%)	1 (9.1%)
Undifferentiated CTD	36 (100%)	3 (8.3%)	31 (86.1%)	2 (5.6%)
Other rheumatic diseases				
Rheumatoid arthritis	58 (100%)	9 (15.5%)	45 (77.6%)	4 (6.9%)
Spondylarthritis	8 (100%)	2 (25.0%)	6 (75.0%)	0
Psoriatic arthritis	14 (100%)	2 (14.3%)	11 (78.6%)	1 (7.1%)
Polymyalgia rheumatica	4 (100%)	0	4 (100%)	0
Reactive arthritis	2 (100%)	2 (100%)	0	0
Enteropathic arthritis	3 (100%)	0	3 (100%)	0
Undifferentiated arthritis	1 (100%)	0	1(100%)	0
Small vessel vasculitis	2 (100%)	0	2 (100%)	0
Large vessel vasculitis	5 (100%)	0	5 (100%)	0

DFS70 = dense fine speckled 70, CTD = connective tissue disease.

significant differences in terms of symptoms and clinical signs between CTD patients with and without anti-DFS70 (Table 5).

The clinical signs, symptoms and comorbidities in the CTD patients with present anti-DFS70 antibody are listed in the Supplemental Material (Supplementary Table 3).

Discussion

To our knowledge, this is the first study on the significance of DFS-70 antibodies in CTD as well as other rheumatic diseases in a large cohort comparing symptoms, clinical signs as well as antibody status between groups.

Our study shows that presence of anti-DFS70 antibody has limited value for the exclusion of CTD in the presence of a positive ANA titer. In 151 (83.0%) of the 182 patients with CTD present, the DFS70 antibody was not detectable, whereas 21 patients (11.5%) had a positive and ten patients (5.5%) a borderline result. To establish a level of comparability with other studies, such as that of Kiefer et al. [22], we chose an ANA titer of ≥ 1:160 as cut-off for calculating the sensitivity, specificity and positive predictive value of anti-DFS70 to exclude CTD presence.

Table 3
Sensitivity, specificity and positive predictive value of the anti-DFS70 antibody in different ANA titers.

a) ANA titer ≥ 1:80		
N = 362	*No present CTD*	*Present CTD*
Anti-DFS70 positive	52	21
Anti-DFS70 negative	145	144
	Sensitivity: 26.4%	Specificity: 87.3%
Positive predictive value= 71.2%		
b) ANA titer ≥ 1:160		
N = 326	*No present CTD*	*Present CTD*
Anti-DFS70 positive	45	21
Anti-DFS70 negative	122	138
	Sensitivity: 26.9%	Specificity: 86.8%
Positive predictive value= 68.2%		
c) ANA titer ≥ 1:640		
N = 167	*No present CTD*	*Present CTD*
Anti-DFS70 positive	17	14
Anti-DFS70 negative	48	88
	Sensitivity: 26.2%	Specificity: 86.3%
Positive predictive value = 54.8%		

ANA = antinuclear antibodies, CTD = connective tissue disease, DFS70 = dense fine speckled 70. Patients with borderline DFS-70 result were excluded.

Taking this ANA titer as a precondition and excluding patients with a borderline anti-DFS70 result, 21 (13.2%) patients of the remaining 159 CTD patients still had a positive test result. We did not observe significant differences in antibody constellation or symptoms and clinical signs between the two groups of patients with positive and negative anti-DFS70 status in the presence of CTD. Therefore, clinical distinction between these two groups was not possible. This is in contrast to findings of Peker et al. [23], who rarely detected anti-DFS70 in the presence of antibodies associated with CTD. Anti-dsDNA was found in only one of the six SLE patients who tested positive for anti-DFS70 (total of 101 SLE patients). Anti-Ro52 was found positive in one SS patient in whom anti-DFS70 antibodies were also identified (anti-DFS70-antibodies were detected in one of the 71 SS patients).

However, our results regarding specific antibodies seem to be similar to those of Muro et al. [24]. They described anti-dsDNA antibodies in six of their seven anti-DFS70-positive SLE patients (total of 124 SLE patients) with anti-Sm also detected in two of them. Anti-SSA was also detected in seven of their eight DFS70 positive SS patients (total of 71 SS patients). In another study, anti-DFS70 autoantibodies were detected in only one of 51 (2.0%) CTD patients [25]. This patient was suffering from SLE and anti-SM and anti-dsDNA antibodies were also found.

In our cohort, there were five patients with SLE who were also DFS70 antibody positive. In two of these five patients, dsDNA autoantibodies could be detected by line immunoassay. Three of these five SLE patients with DFS70 antibody present were additionally tested for the presence of anti-dsDNA antibody by ELISA. In all three cases, elevated values were detected. In one of the cases where no ELISA for anti-dsDNA was performed, anti-SM was detected by immunoassay. In all of our anti-DFS70 positive patients with SS, anti-SSA antibodies could be observed by line immunoassay as well as ELISA/immunoassay.

If specific antibodies cannot be detected, the anti-DFS70 test might help to rule out CTD. Infantine et al. [4] also reached this conclusion from their study. They found additional anti-ENA (extractable nuclear antigen antibodies) in all of their anti-DFS70 positive patients with existing CTD (384 (50.0%) of all 768 (100%) patients had a CTD). The authors concluded that a combined approach, consisting of detection of anti-DFS70 antibodies in ANA positive patients and exclusion of ENA antibodies, could help the treating rheumatologist to exclude a CTD.

Choi et al. also came to this conclusion in their study on the prevalence of anti-DFS70 autoantibodies in SLE patients. In their study,

Table 4
Specific antibodies determined by line immunoassay in patients with present CTD and occurrence of anti-DFS70 antibody.

CTD	Specific antibodies	Present CTD + anti-DFS70 positive			Present CTD + anti-DFS70 negative			p-value
		Specific systemic antibodies present	*Specific systemic antibodies not present*	*total number of patients tested (100%)*	*Specific systemic antibodies present*	*Specific systemic antibodies not present*	*total number of patients tested (100%)*	
SLE	anti-dsDNA	2 (40.0%)	3 (60.0%)	5 (100%)	13 (23.2%)	43 (76.8%)	56 (100%)	0.404
	anti-Sm	1 (20.0%)	4 (80.0%)	5 (100%)	10 (16.4%)	51 (83.6%)	61 (100%)	0.835
SSc	anti-Scl-70	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)	3 (20.2%)	12 (80.0%)	15 (100%)	0.099
pSS	anti-SSA (Ro52/ TRIM2)	3 (100%)	0 (0.0%)	3 (100%)	24 (85.7%)	4 (14.3%)	28 (100%)	0.483
	anti-SSA (Ro) 60kD	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)	25 (89.3%)	3 (10.7%)	28 (100%)	0.267
	anti-SSB (La)	1 (33.3%)	2 (67.7%)	3 (100%)	10 (40.0%)	15 (60.0%)	25 (100%)	0.823
MCTD	anti-nRNP/Sm	2 (40.0%)	3 (60.0%)	5 (100%)	10 (66.7%)	5 (33.3%)	15 (100%)	0.292
PM/DM	anti-Jo1	0	2 (100%)	2 (100%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	8 (100%)	0.301

CTD = connective tissue disease, DFS70 = dense fine speckled, SLE = systemic lupus erythematosus, SSc = systemic sclerosis-scleroderma, pSS = primary Sjögren's syndrome, MCTD = mixed connective tissue disease, PM/DM = polymyositis/dermatomyositis, dsDNA = double-stranded deoxyribonucleic acid, Sm = Smith, Scl = scleroderma, SSA = Sjögren's syndrome A, SSB = Sjögren's syndrome B, nRNP/SM = ribonucleoprotein/Smith, Jo1 = histidyl tRNA synthetase.

monospecific anti-DFS70 autoantibodies also occurred in only a very small proportion (13 of 1137 patients, 1.1%) of SLE patients [26].

In conclusion, this observation again emphasizes the importance of close examination of the patient by the treating rheumatologist and measurement of disease-specific antibodies in addition to ANA in IFT.

The authors of a study on the clinical phenotypes of patients with anti-DFS70 also came to this conclusion [27]. Patients with anti-DFS70 antibodies should be closely examined for clinical signs and symptoms, supplemented by the detection of disease-specific autoantibodies.

Kiefer et al. [22] reported results similar to our study regarding the limited clinical value of the DFS70 antibody. The authors detected CTD in two of their 19 anti-DFS70 positive (10.5%) (ANA $\geq$ 1:80) patients. The prevalence of anti-DFS70 in their study was 7.0% (19/

Table 5
Symptoms and clinical signs of patients with CTD and present anti-DFS70 antibody.

Symptoms/ clinical signs	Present CTD and anti-DFS70 positive *N* = 21 (100%)	Present CTD and anti-DFS70 negative *N* = 151 (100%)	p-value
Symptoms			
Arthralgia	12 (57.1%)	88 (58.3%)	1.000
Myalgia	8 (38.1%)	54 (35.8%)	0.813
Morning stiffness	2 (9.5%)	23 (15.2%)	0.742
Photosensitivity	1 (4.8%)	19 (12.6%)	0.474
Fatigue	1 (4.8%)	46 (30.5%)	0.016*
Anamnestic joint inflammation	0	3 (2.0%)	1.000
Malaise	0	1 (0.7%)	1.000
Dysphagia	1 (4.8%)	5 (3.3%)	0.548
Clinical Signs			
Sicca syndrome	7 (33.3%)	68 (45.0%)	0.355
Raynaud's phenomenon	8 (38.1%)	58 (38.4%)	1.000
Alopecia	0	5 (3.3%)	1.000
Butterfly erythema/SLE-typical skin lesions	5 (23.8%)	30 (19.9%)	0.772
Puffy fingers	0	9 (6.0%)	0.603
Gaenslen sign of hands positive	0	3 (2.0%)	1.000
Gaenslen sign of feet positive	0	1 (0.7%)	1.000
Sclerodactyly	1 (4.8%)	3 (2.0%)	0.409
Joint contractures	0	1 (0.7%)	1.000
Microstomia	1 (4.8%)	3 (2.0%)	0.409
Esophageal motility disorders	1 (4.8%)	6 (4.0%)	1.000
Fingertip ulceration/ Rhagades on acra	3 (14.3%)	11 (7.3%)	0.272
Hair loss	0	8 (5.3%)	0.598
Oral ulcers	1 (4.8%)	14 (9.3%)	0.698
Dactylitis	0	1 (0.7%)	1.000
Arthritis	5 (23.8%)	47 (31.1%)	0.616
Recurrent sialadenitis	0	7 (4.6%)	0.600
Edema	3 (14.3%)	4 (2.6%)	0.040*
Limited mobility of joints/ Joint contractures	1 (4.8%)	6 (4.0%)	0.864
Skin sclerosis	0	1 (0.7%)	1.000
Telangiectasia	2 (9.5%)	7 (4.6%)	0.302
Schirmer's test positive	2 (9.5%)	4 (2.6%)	0.158
Multiple abortions	0	2 (1.3%)	1.000
Enthesitis	0	1 (0.7%)	1.000
Neurological deficits	0	3 (2.0%)	1.000
Ocular inflammation	0	2 (1.3%)	1.000
Subfebrile temperatures	0	2 (1.3%)	1.000
Fever	2 (9.5%)	7 (4.6%)	0.302
Frenulum shortening	0	1 (0.7%)	1.000

CTD = connective tissue disease, DFS70 = dense fine speckled 70, * = < 0,05.

270 patients) and 33.7% (91) of their total 270 patients were diagnosed with CTD. Unfortunately, the authors failed to measure specific antibodies.

The sensitivity to exclude CTD in the presence of the DFS70 antibody was only 10.8−13.6% in their study, depending on the ANA titer level of ≥ 1:80 and ≥ 1:320, respectively. An ANA titer of ≥ 1:640 showed a sensitivity of 12.2%.

In comparison, we detected 21 patients with CTD in all 73 patients (28.8%) (ANA ≥ 1:80) with positive anti-DFS70 antibody. We determined a sensitivity of 26.4% with a titer of ≥ 1:80 and 26.2% with a titer of ≥ 1:640 and a prevalence of 17.6% (81/460 patients) for the occurrence of anti-DFS70 antibody. This still appears to be too low for a definite exclusion of CTD.

In the study by Kiefer et al., the positive predictive value varied from 85.7% to 94.7% depending on the ANA titer (85.7% for ANA ≥ 1:640 and 94.7% for ANA ≥ 1:320) [22]. In our study, we observed positive predictive values between 54.8% and 71.2%. Interestingly, the positive predictive value, i.e., absence of CTD with positive anti-DFS70 result, was lowest in both studies with ANA titers ≥ 1:640. To determine whether this observation is clinically relevant or a mere coincidence, a more detailed investigation is required.

As is the case with our study, all studies mentioned in this section were performed retrospectively.

This study has certain limitations which are inherent with the retrospective design. Patients were tested for the presence of the DFS70 antibody in our clinic as they were suspected of suffering from CTD. This leads to a certain pre-selection bias, making our study results not generalizable. In addition, the association of anti-DFS70 with malignant diseases or other disorders has been insufficiently examined, and consequently, it is unclear as to what extent such other disease might affect the anti-DFS70 test result.

In conclusion, autoantibodies against DFS70 are also frequently observed in CTD patients and are therefore not a valid exclusion criterion. We could not detect CTD in 68.2% (ANA titers ≥ 1:160) of patients who tested positive for anti-DFS70.

Therefore, the anti-DFS70 test may be used as a guide in difficult clinical situations and the additional exclusion of other autoantibodies may render the presence of CTD even less probable. As patients with monospecific anti-DFS70 antibodies were rarely diagnosed with CTD in our cohort (4.8% of all CTD patients with present DFS70-antibody were monospecific), we support the proposal of Infantino et al. [4].

We suggest that a positive ANA-IIF test should be followed by an anti-ENA specificity test. If ENAs are detected, these patients must continue to be evaluated for the presence of CTD.

If no ENAs are detected and a HEp-2 IIF pattern seems to be typical for anti-DFS70, testing for the anti-DFS70 antibody should be performed with a confirmatory antigen-specific assay, i.e. line immunoassay or ELISA.

Patients with exclusively DFS70 antibodies seem less likely to have CTD and hence, other conditions should be considered to explain their symptoms [4,28]

However, further studies are needed to investigate this hypothesis.

Declaration of Competing Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Funding

The study did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.semarthrit.2021.12.006.

References

[1] Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases: epitope specificity. Ann N Y Acad Sci 2010;1183(1):267–87. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05127.x.
[2] Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin Dev Immunol 2012;2012:1–6. doi: 10.1155/2012/494356.
[3] Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2012;11(9):642–5. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.005.
[4] Infantino M, Pregnolato F, Bentow C, et al. Only monospecific anti-DFS70 antibodies aid in the exclusion of antinuclear antibody associated rheumatic diseases: an Italian experience. Clin Chem Lab Med CCLM 2019;57(11):1764–9. doi: 10.1515/cclm-2019-0454.
[5] Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. J Urol 1994;151(3):587–92. doi: 10.1016/S0022-5347(17)35023-1.
[6] Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EKL, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. J Allergy Clin Immunol 2000;105(6):1211–20. doi: 10.1067/mai.2000.107039.
[7] O'Rourke DJ, DiJohnson DA, Caiazzo RJ, et al. Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen. Clin Chim Acta 2012;413(5−6):561–7. doi: 10.1016/j.cca.2011.11.027.
[8] Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. Arthritis Rheum 2004;50(3):892–900. doi: 10.1002/art.20096.
[9] Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. Lancet 2013;382(9894):797–808. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61499-3.
[10] Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals: blood Donors, Hospital Personnel, and Relatives of Patients With Autoimmune Diseases. JCR J Clin Rheumatol 2009;15(7):325–9. doi: 10.1097/RHU.0b013e3181bb971b.
[11] van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis 2013;72(11):1747–55. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204424.
[12] Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012;64(8):2677–86. doi: 10.1002/art.34473.
[13] Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European league against Rheumatism/American college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheumatol 2019;71(9):1400–12. doi: 10.1002/art.40930.
[14] Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. 2016 American college of Rheumatology/European league against rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. Arthritis Rheumatol 2017;69(1):35–45. doi: 10.1002/art.39859.
[15] Vitali C. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002;61(6):554–8. doi: 10.1136/ard.61.6.554.
[16] Kasukawa R. Mixed connective tissue disease. Intern Med 1999;38(5):386–93. doi: 10.2169/internalmedicine.38.386.
[17] Mosca M, Talarico R, Bombardieri S. Mixed connective tissue disease Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, eds. Diagnostic criteria in autoimmune diseases. Humana Press; 2008. p. 43–6. doi: 10.1007/978-1-60327-285-8_8.
[18] Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med 1972;52(2):148–59. doi: 10.1016/0002-9343(72)90064-2.
[19] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis: (first of two parts). N Engl J Med 1975;292(7):344–7. doi: 10.1056/NEJM197502132920706.
[20] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis: (second of two parts). N Engl J Med 1975;292(8):403–7. doi: 10.1056/NEJM197502202920807.
[21] Tanimoto K, Nakano K, Kano S, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 1995;22(4):668–74.
[22] Kiefer D, von Brunn M, Baraliakos X, Andreica I, Braun J. Klinische Wertigkeit der Bestimmung von DFS70-Antikörpern für den Ausschluss von Kollagenosen. Z Für Rheumatol 2020;79(8):749–54. doi: 10.1007/s00393-019-00741-x.
[23] Peker BO, Şener AG, Tarhan EF, Kaya S. Investigation of anti-DFS70 antibody in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. Clin Rheumatol 2019;38(12):3627–33. doi: 10.1007/s10067-019-04730-y.
[24] Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody−positive patients with autoimmune rheumatic disease. Lupus 2008;17(3):171–6. doi: 10.1177/0961203307086311.

[25] Shovman O, Gilburd B, Chayat C, et al. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. Clin Exp Rheumatol 2018;36(1):121–6.

[26] Choi MY, Clarke AE, St Pierre Y, et al. The prevalence and determinants of anti-DFS70 autoantibodies in an international inception cohort of systemic lupus erythematosus patients. Lupus 2017;26(10):1051–9. doi: 10.1177/0961203317692437.

[27] Miyara M, Albesa R, Charuel JL, et al. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. Clin Dev Immunol 2013;2013:1–8. doi: 10.1155/2013/703759.

[28] Mahler M, Andrade LE, Casiano CA, Malyavantham K, Fritzler MJ. Anti-DFS70 antibodies: an update on our current understanding and their clinical usefulness. Expert Rev Clin Immunol 2019;15(3):241–50. doi: 10.1080/1744666X.2019.1562903.

Supplementary Table 1: Specific antibodies in patients with present CTD and occurrence of anti-DFS70 antibody (ELISA)

CTD	Specific systemic antibodies	Present CTD + anti-DFS70 positive			Present CTD + anti-DFS70 negative			p-value
		Specific rheumatological antibodies present	*Specific rheumatological antibodies not present*	*total number of patients tested (100%)*	*Specific rheumatological antibodies present*	*Specific rheumatological antibodies not present*	*total number of patients tested (100%)*	
SLE	Anti-dsDNA	3 (100%)	0	3 (100%)	35 (58.3%)	25 (41.7%)	60 (100%)	0.270
	Anti-Sm	1 (25.0%)	3 (75.0%)	4 (100%)	5 (15.8%)	22 (81.5%)	27 (100%)	1.000
SSc	Anti-Scl-70	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (20%)	8 (80%)	10 (100%)	0.091
SS	Anti-SSA (Ro) 52kD	3 (100%)	0	3 (100%)	23 (92.0%)	2 (8.0%)	25 (100%)	1.000
	Anti-SSA (Ro) 60kD	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)	24 (96.0%)	1 (4.0%)	25 (100%)	0.206
	Anti-SSB (La)	1 (50.0%)	1 (50%)	2 (100%)	13 (61.9%)	8 (38.1%)	21 (100%)	1.000
MCTD	Anti-U1-RNP/A, C	1 (100%)	0	1 (100%)	10 (83.3%)	2 (16.7%)	12 (100%)	1.000
PM/DM	Anti-Jo1	0	0	0	2 (50.0%)	2 (50.0%)	4 (100%)	-

CTD= connective tissue disease, DFS70= dense fine speckled, SLE= systemic lupus erythematodes, SSc= systemic sclerosis-scleroderma, SS= Sjögren's syndrome, MCTD= mixed connective tissue disease, dsDNA= double-stranded deoxyribonucleic acid, Sm= Smith, Scl= scleroderma, SSA=Sjögren's syndrome A, SSB=Sjögren's syndrome B, nRNP/SM= ribonucleoprotein/Smith, Jo1= histidyl tRNA synthetase

Supplementary Table 2: Laboratory results of patients with present CTD and occurrence of anti-DFS70 antibody

Patient ID	Connective Tissue disease	Anti-DFS70 (line Immunoassay)	IFT pattern	IFT-Titer	Positive results in EUROLINE ANA Profile 3 plus DFS70 (IgG) line immunoassay	Positive immunoassay/ELISA results
1	PM/DM	positive	granular	1 : 320	-	anti-Cardiolipin IgM 14 U/ml low positive
2	SSc	positive	granular	1 : 10240	anti-SSA (Ro-52) strongly positive, anti-SS-A (Ro-60) strongly positive	anti-SSA (Ro-52) 114 U/ml [positive], anti-SS-A (Ro-60) >240 U/ml [positive]
			nucleolar	1 : 10240	anti-Scl-70 strongly positive	anti-Scl-70 > 320 U/mL [positive]
3	SLE	positive	homogeneous	1 : 5120	anti-nucleosomes strongly positive, anti-SSA (Ro-52) positive, anti-SS-A (Ro-60) positive	anti-dsDNA 1997.3 IU/ml [positive] anti-SS-A (Ro-60) 78 U/ml [positive]
			granular	1 : 10240	-	-
4	SLE	positive	granular	1 : 1280	anti-dsDNA positive, AMA M2 positive, anti-nucleosome positive, anti-histone positive, anti SS-B positive	anti-dsDNA 797.93 IU/ml, anti-histone 93.59 RE/ml, AMA M2 56.91 RE/ml
5	MCTD	strongly positive	granular	1 : 2560	anti-histone positive, anti nRNP/Sm positive	-
6	pSS	positive	granular	1 : 20480	anti-SSA (Ro-52) strongly positive	anti-SSA (Ro-52) 64 U/ml [positive]
7	PM/DM	positive	granular	1 : 320	anti-Mi-2 beta positive	-
			cytoplasmatic	1 : 640	anti-SRP protein positive	anti-Cardiolipin IgM 15 U/ml low positive
8	SSc	strongly positive	granular	1 : 2560	anti-nRNP/Sm positive	-
9	UCTD	positive	cytoplasmatic	1 : 1280	anti-SSA (Ro-52) positive	anti-SSA (Ro-52) 2.2 U/ml [negative]
			granular	1 : 320	-	-
10	MCTD	positive	granular	1 : 2560	-	-
			nuclear dots	1 : 20480	anti-Sp100 strongly positive, anti-PML strong positive, anti-gp210 positive	-
11	pSS	positive	granular	1 : 2560	anti-SSA (Ro-52) strongly positive, anti-SS-A (Ro-60) strongly positive	anti-SSA (Ro-52) 299 U/ml [positive], anti-SS-A (Ro-60) >282 U/ml [positive]
12	SSc	positive	granular	1 : 640	-	-
			homogeneous	1 : 2560	-	-
			nucleolar	1 : 1280	anti-Scl-70 strongly positive	anti-Scl-70 227 U/mL [positive]
13	UCTD	strongly positive	centromer	1 : 10240	anti-centromere A strongly positive, anti-centromere B strongly positive	anti-centromere B 319 U/ml [positive]
			granular	1 : 10240	-	-
14	SLE	strongly positive	granular	1 : 2560	anti-nRNP/Sm strongly positive, anti-Sm strongly positive, AMA M2 positive	anti-U1RNP/A,C 67 U/ml [positive], anti-U1 RNP (70 kD) 28 U/ml [positive], anti-Sm 442 U/ml [positive], AMA M2 5.55 RE/ml [negative]
15	SLE	strongly positive	granular	1 : 640	-	-
			nuclear dots	1 : 1280	-	-
16	pSS	positive	granular	1 : 640	anti-SSA (Ro-52) strongly positive, anti-SS-A (Ro-60) strongly positive, anti SS-B positive, anti-histone positive	anti-SSA (Ro-52) 154 U/ml [positive], anti-SS-A (Ro-60) >282 U/ml [positive], anti SS-B (La) 74 U/ml [positive], anti-histone < 2 RE/ml [negative]
17	MCTD	strongly positive	granular	1 : 640	anti-SS-A (Ro-52) borderline	ANA screening [= ELIA Symphony] 0.2 U/mL negative, CTD screening [= ELIA CTD Screen] 0.2 U/mL [negative]
18	MCTD	strongly positive	granular	1 : 1280	anti-nRNP/Sm strongly positive, anti-ribosomal proteins positive	anti-U1RNP/A,C 66 U/ml [positive]
19	SLE	positive	homogeneous	1 : 2560	anti-dsDNA strongly positive, nucleosomes positive, anti-histone positive	anti-dsDNA 639.7 IU/ml [positive], anti-histone 71.2 RE/ml [positive]
			granular	1 : 1280	-	-
20	MCTD	strongly positive	granular	1 : 1280	-	-
21	UCTD	positive	granular	1 : 320	anti-histone positive, anti-SS-A(Ro-60) borderline	anti-SS-A(Ro-60) 79 U/ml [positive], anti-histone 2.4 RE/ml [negative]
			nucleolar	1 : 640	anti-Scl-70 positive	anti-Scl-70 181 U/ml [positive]

CTD = connective tissue disease, DFS70 = dense fine speckled, SLE = systemic lupus erythematosus, SSc = systemic sclerosis-scleroderma, pSS = primary Sjögren's syndrome, MCTD = mixed connective tissue disease, PM/DM = polymyositis/dermatomyositis, dsDNA = double-stranded deoxyribonucleic acid, Sm = Smith, Scl = scleroderma, SSA = Sjögren's syndrome A, SSB = Sjögren's syndrome B, nRNP/SM = ribonucleoprotein/Smith, anti-U1RNP/A,C = anti-U1RNP antibodies, AMA M2= Anti-mitochondrial antibodies M2 subtype, SRP=Signal Recognition Particle, anti-Sp100=antibodies against the soluble core body protein Sp100, anti-PML= autoantibodies to PML (promyelocytic leukemia antigen), anti-gp210= Anti-glycoprotein-210 antibodies

Supplementary Table 3: Characteristics of patients with present CTD and occurrence of anti-DFS70 antibody

Patient ID	Sex	CTD	Duration of illness (years)	Clinical signs and symptoms	Comorbidities
1	F	PM/DM	9	Arthralgia	Hypothyroidism, bronchial asthma, polyserositis
2	M	SSc	17	Raynaud's syndrome, digital ulcerations, dysphagia, Sicca-syndrome	Hypothyroidism, pulmonary fibrosis, pulmonary arterial hypertension
3	F	SLE	<1	Subacute cutaneous lupus erythematosus	Dementia
4	F	SLE	6	Raynaud's syndrome, butterfly erythema, arthralgia, myalgia	Epilepsy, secondary antiphospholipid syndrome, endocarditis, polyserositis
5	F	MCTD	19	Joint deformities, polyarthritis	-
6	F	pSS	<1	Raynaud's syndrome, positive Schirmer test, cervical lymphadenopathy, Sicca syndrome, arthralgia	Osteoporosis, monoclonal gammopathy type IgM
7	F	PM/DM	10	Myalgia, arthralgia	-
8	F	SSc	<1	Sicca syndrome, myalgia, arthralgia, dyspnea, dysphagia	Hashimoto's thyroiditis
9	F	UCTD	-	Schirmer test positive, Gaenslen sign positive, Raynaud's syndrome, oral aphthae, arthralgia, myalgia, Sicca-Syndrome, fever, morning stiffness	Psoriasis
10	F	MCTD	-	Cutaneous vasculitis, arthralgia, myalgia, fever, fatigue, edema in the distal extremities, pectangial symptoms with dyspnea	Primary biliary cholangitis
11	F	pSS	-	Raynaud's syndrome, photosensitivity of the skin	Gastritis, Otitis
12	M	SSc	20	Acral necrosis and ulceration, sclerodactyly, microstomia, telangiectasia, sclerodactyly	Pulmonary arterial hypertension, polyneuropathy, gonarthrosis, glomerulonephritis, pulmonary fibrosis, serositis, oesophageal dyskinesia, pulmonary arterial hypertension
13	F	UCTD	6	Raynaud's syndrome, myalgia, arthralgia, Sicca-syndrome	Hypothyroidism
14	F	SLE	-	Butterfly erythema, arthralgia	-
15	F	SLE	18	-	Hashimoto's thyroiditis, pulmonary emphysema
16	F	pSS	21	Raynaud's syndrome, telangiectasia, Sicca-syndrome, arthralgia, paresthesia	Chronic obstructive pulmonary disease, rosacea, finger joint polyarthrosis
17	F	MCTD	-	Digital ulcerations, synovitis, arthralgia, myalgia, Sicca-syndrome, morning stiffness	Hypothyroidism, breast cancer, pulmonary arterial hypertension
18	F	MCTD	1	Arthritis	Obesity, cutaneous lupus erythematosus
19	F	SLE	<1	Pretibial oedema, macrohematuria, arthralgia, weight gain, dyspnea, retrosternal pressure sensation	Iron-deficiency anemia, glomerulonephritis of the SLE-associated type class IV + V Polyserositis
20	F	MCTD	28	Butterfly erythema, arthritis, dyspnea, myalgia, proteinuria	Chronic obstructive pulmonary disease, osteoporosis, pulmonary arterial hypertension, pulmonary fibrosis
21	F	UCTD	-	-	Chronic renal insufficiency, secondary hyperparathyroidism

CTD= Connective tissue disease, SLE = systemic lupus erythematosus, SSc = systemic sclerosis-scleroderma, pSS = primary Sjögren's syndrome, MCTD = mixed connective tissue disease, UCTD=Undifferentiated connective tissue disease, PM/DM = polymyositis/dermatomyositis, F=female, M=male