

Manfred Herold*, Werner Klotz, Ulrich Sack und Karsten Conrad

ICAP – ein Versuch zur einheitlichen Beschreibung der Fluoreszenzmuster von antizellulären Antikörpern auf HEp-2-Zellen

ICAP – an effort towards a uniform description of fluorescence patterns of anticellular antibodies on HEp-2 cells

<https://doi.org/10.1515/labmed-2017-0038>

Eingang 5.4.2017; Akzeptanz 5.5.2017; vorab online veröffentlicht 1.8.2017

Zusammenfassung: Primäres Ziel von ICAP (internationaler Konsens für antinukleäre Antikörpermuster) ist es, einen Konsens zu finden zur Beschreibung der Fluoreszenzmuster, die mit indirekter Immunfluoreszenztechnik auf HEp-2-Zellen erkannt werden können. 28 Muster (14 Kern-, 9 zytoplasmatische und 5 mitotische Muster) wurden bisher definiert. Neben der Musterbeschreibung wurden alle Muster auch mit AC-Nummern gekennzeichnet, um eine von der Sprache unabhängige Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Alle ICAP-Ergebnisse können von der ICAP-Internetseite (www.anapatterns.org) abgerufen werden. ICAP ist ein fortlaufender Prozess. Das nächste und 4. ICAP-Treffen wird im September 2017 im Rahmen des 13. Autoantikörpersymposiums in Dresden stattfinden (www.gfid-ev.de). Anstehende ICAP-Aufgaben sind die Ergänzung der Fluoreszenzmuster, die Erweiterung der Bildersammlung und die genauere Beschreibung der klinischen Bedeutung einzelner Muster.

***Korrespondenz: Ao. Univ.-Prof. DDr. Manfred Herold,**
Medizinische Universität Innsbruck, Tirol Kliniken LKH Innsbruck,
Universitätsklinik für Innere Medizin II, Anichstraße 35, 6020
Innsbruck, Österreich, Tel.: +43 512 504 23321,
Fax: +43 512 504 24213, E-Mail: manfred.herold@i-med.ac.at;
manfred.herold@tirol-kliniken.at; and Universitätsklinik für Innere
Medizin II, EASI Austria, Wien, Österreich
Werner Klotz: Medizinische Universität Innsbruck, Universitätsklinik
für Innere Medizin II, Innsbruck, Österreich
Ulrich Sack: EASI Germany und DGKL-Sektion Immundiagnostik,
Deutschland; und Medizinische Fakultät der Universität Leipzig,
Institut für Klinische Immunologie, Leipzig, Deutschland
Karsten Conrad: EASI Germany und DGKL-Sektion Immundiagnostik,
Deutschland; und Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät
der Technischen Universität Dresden, Dresden, Deutschland

Schlüsselwörter: HEp-2; indirekte Immunfluoreszenzmuster; Konsens.

Abstract: To reach consensus in the description of immunofluorescence patterns on HEp-2 cells is the primary goal of International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns (ICAP). Twenty eight patterns (fourteen nuclear, nine cytoplasmic and five mitotic patterns) have been defined. Beside the description, all patterns were branded with an AC-number to ensure comparability independently of the language. All ICAP results are also available online (www.anapatterns.org). ICAP is an ongoing process. The next and 4th ICAP meeting is planned for September 2017 in the context of the 13th Dresden Symposium on Autoantibodies in Dresden, Germany (www.gfid-ev.de). Pending ICAP duties are the addition of fluorescence patterns, the extension of the immunofluorescence image collection, and the detailed description of the clinical relevance of single patterns.

Keywords: consensus; HEp-2; indirect immunofluorescence patterns.

Einleitung

ICAP (International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns) wurde während des 12th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA) 2014 in São Paulo als Initiative gegründet. Die Arbeitsgruppe setzte sich zusammen aus Mitgliedern des Autoantikörper-Standardisierungskomitees, einem Unterkomitee des International Union of Immunological Societies (IUIS) Quality Assessment and Standardization Committee in

Verbindung mit den Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) und anderen geladenen und in der Autoimmundiagnostik tätigen Spezialisten [1]. Die Zielsetzung von ICAP ist die einheitliche Beschreibung der vielen Fluoreszenzmuster, die mit indirekter Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen erkannt werden können.

Nicht durch Zufall fand das erste ICAP Treffen in São Paulo statt, da in Brasilien bereits seit Jahren intensive Bemühungen zum Thema Autoimmundiagnostik auf HEp-2-Zellen und zur Definition von Immunfluoreszenzmustern stattfanden und durch vier Konsensuskonferenzen, zuletzt 2012, gut belegt wurden [2].

Der anfängliche Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) erfolgte mit zellreichen tierischen Gewebeschnitten, auf denen sich durch das Vorliegen von durchwegs ruhenden Zellen in der Interphase die Beurteilung rein auf Fluoreszenzen im Zellkern beschränkte. Mit der Einführung der HEp-2-Zelle als Substrat, in der Zellen in allen Phasen des Zellzyklus ausreichend vorhanden sind, erwachte zunehmend das Bewusstsein, dass Autoantikörper (AAK) nicht nur an Strukturen des Kerns binden, sondern auch an Bestandteile des Zytoplasmas oder an Strukturen, die während der Mitosephasen auftreten. Der Begriff antizelluläre Antikörper wäre für das Ergebnis des Antikörper-Suchtests auf HEp-2-Zellen zwar treffender [3], kann aber aus praktikablen Gründen nicht eingeführt werden. In den meisten Ländern, in denen der ANA-Test durch öffentliche oder private Kostenträger bezahlt wird, ist es nicht einfach möglich, den Namen eines eingeführten und genehmigten Tests zu ändern.

ICAP hat es sich zum Ziel gesetzt, eine gemeinsame Nomenklatur zur Beschreibung der vielen, durch indirekte Immunfluoreszenz (iIF) auf HEp-2-Zellen erkennbaren Strukturen zu erarbeiten. Bereits vorangegangene Arbeiten [2–5] und Vorschläge bezüglich Musterbeschreibungen auf HEp-2-Zellen wurden berücksichtigt.

Bisher fanden drei ICAP-Treffen statt, das erste 2014 in São Paulo [1], das zweite 2015 in Dresden [6, 7] und das dritte 2016 in Kyoto im Rahmen des 13th IWAA. Über eine Grundstruktur der Musterzuteilung konnte Einigkeit erzielt werden, ebenso wie über die Benennung von 28 Mustern, von denen sich 14 Muster auf den Zellkern, 9 auf das Zytoplasma und 5 auf Strukturen während der Mitosephasen beziehen. Die mögliche Ergänzung durch weitere Muster wurde bereits zu Beginn besprochen, eine Einigung bezüglich weiterer Musterbeschreibungen konnte aber bisher noch nicht erreicht werden.

Ziel der ICAP-Initiative ist die weltweite Harmonisierung der Musterbeschreibungen und der dazugehörigen Nomenklatur der antizellulären AAK. Daher wurde von Anfang an eine ausführliche, in englischer Sprache

verfasste und leicht zugängliche Webseite geschaffen (www.anapatterns.org). Um aber die Verbreitung und Akzeptanz weiter zu fördern, wird der Text der Webseite laufend in andere Sprachen übersetzt, wobei versucht wird, für die Übersetzung entweder Mitglieder der ICAP-Arbeitsgruppe zu beauftragen oder Wissenschaftler, die in nationalen oder internationalen autoimmunen Arbeitsgruppen tätig sind, zu gewinnen. Aktuell ist der Text der Webseite in 8 weiteren Sprachen (2 Versionen Portugiesisch, Spanisch, Italienisch, Deutsch, 2 Versionen Chinesisch und Französisch) vorliegend. Weitere Übersetzungen sind geplant.

Die deutsche Übersetzung wurde von Vertretern der österreichischen (Manfred Herold, Werner Klotz) und der deutschen (Ulrich Sack, Karsten Conrad) EASI-Gruppe durchgeführt. Vertretern der anderen deutschsprachigen Länder Liechtenstein (Walter Fierz, Thomas Lung) und Schweiz (Ingmar Heinen und die Mitglieder der Kommission Labordiagnostik, KLD der Schweizer Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, SSAI) wurde die deutsche Übersetzung vorgelegt und deren Meinung zur Übersetzung eingeholt.

Was bisher bei ICAP erreicht wurde

Das erste ICAP-Treffen in São Paulo im Rahmen des 12th IWAA war als Arbeitssitzung angekündigt und konnte nach Voranmeldung von jedem Interessierten besucht werden. Insgesamt waren 78 Teilnehmer aus 15 Ländern anwesend. Die Grundlage für ICAP wurde in dieser ersten Arbeitssitzung durch vier aufeinanderfolgende Sitzungseinheiten gesetzt. Die vier Sitzungen hatten in Anlehnung an den IV. Brasilianischen Konsens die Arbeitstitel nukleäre, nukleoläre, zytoplasmatische und mitotische & komplexe Muster. Für jede Sitzung wurden zwei Diskussionsleiter gewählt, die zuerst ihre Vorschläge zum Thema präsentierten. Kernmuster wurden von Karsten Conrad (Deutschland) und Jan Damoiseaux (Niederlande) koordiniert, nukleoläre Muster von Minoru Satoh (Japan) und Orlando Gabriel Carballo (Argentinien), zytoplasmatische Muster von Edward K. L. Chan (USA) und Carlos A. von Mühlen (Brasilien) und mitotische & komplexe Muster von Tsuneyo Mimori (Japan) und Manfred Herold (Österreich). Nach jeder Sitzung folgte eine ausführliche Diskussion mit den anwesenden Teilnehmern und es wurde Einigkeit erzielt, dass drei Kompartimente ausreichend sind. Nukleoläre Muster wurden in die nukleären Muster integriert. Daneben wurden noch zytoplasmatische und mitotische Muster (Abbildung 1) vorgegeben. Verzichtet wurde auf eine Kategorie „komplexe Muster“, wie sie im vierten

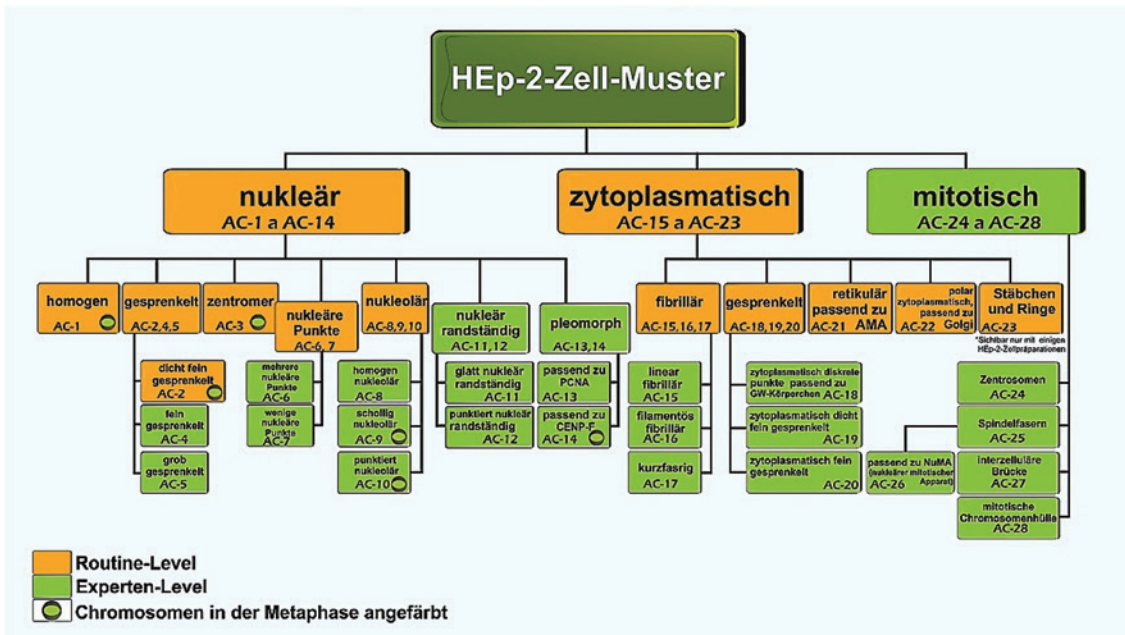


Abbildung 1: Nomenklatur und Klassifikationsschema für nukleäre, nukleoläre, zytoplasmatische und mitotische iIF-Muster auf HEp-2-Zellen. Orange hinterlegte Muster sollten von jedem Labor erkannt werden, das Autoantikörpersuche mit iIF auf HEp-2-Zellen durchführt. Grün hinterlegte Felder kennzeichnen Muster, die von erfahrenen Befundern erkannt werden können.

brasilianischen Konsens vorgeschlagen wurde. Aber in Übereinstimmung mit den brasilianischen Empfehlungen wurden einige Muster herausgehoben und als unbedingt zu beschreibend gekennzeichnet (Routine-Level; orange Farbe), während der Rest der Muster von erfahrenen und auf ANA-Beurteilung spezialisierten Beobachtern erkannt werden sollte (Experten-Level; grüne Farbe). Die Grenze zwischen Routine- und Experten-Level ist eher willkürlich und basiert zum einen auf der Überlegung der leicht erkennbaren Muster und zum anderen auf deren klinischer Bedeutung. So wurde das dicht fein gesprenkelte Muster (AC-2), das zwar erst vor Kurzem definiert wurde [8, 9], aber durch seine charakteristische Anfärbung (granuläre nukleoplasmatische Färbung mit charakteristischer Heterogenität in Größe, Helligkeit und Verteilung der Granula im Nukleoplasma der Interphasekerne und in gleicher Weise im kondensierten Chromosomenmaterial mitotischer Zellen) gut erkennbar ist und dem eine besondere Bedeutung zukommt in der Beurteilung seiner klinischen Relevanz dem Routine-Level zugeordnet. Das Vorliegen von Anti-DFS70-Antikörpern spricht eher gegen eine systemische ANA-assoziierte Autoimmunerkrankung [10, 11], weshalb vor allem die Abtrennung vom homogenen Muster (AC-1) von Bedeutung ist.

Einigkeit bestand auch in der Entscheidung, dass jedes Muster neben seiner Bezeichnung und der Musterbeschreibung auch codiert werden soll, um eine einfache, objektive, international vergleichbare und EDV-kompatible

Zuordnung zu ermöglichen. Die Muster werden generell mit AC (anticellular) gekennzeichnet und mit einer Nummer versehen. Verschiedene Varianten der Nummerierung wurden diskutiert und schließlich ein einfaches Schema beschlossen. Die Zuordnung der AC-Nummer erfolgt im Entscheidungsdiagramm in jeder Kategorie von links nach rechts und von oben nach unten. Damit ergeben sich insgesamt 28 Muster, davon 14 Kernmuster beginnend mit dem homogenen Muster als AC-1 bis zu AC-14 (pleomorphes Kernmuster passend zu CENP-F), gefolgt von 9 zytoplasmatischen Mustern und 5 mitotischen Mustern. Auf die Unterscheidung zwischen den beiden grob gesprenkelten Mustern „coarse speckled“ und „large speckled“, wie sie in anderen Konsensarbeiten [2, 3] beschrieben werden, wurde verzichtet. Auch war allen bewusst, dass noch andere Muster wie zum Beispiel durch DNA-Topoisomerase I/Scl-70-Antikörper hervorgerufen, nicht durch eine Nummer erfasst worden sind und vermutlich noch andere Muster folgen werden. Muster, die später in die Liste aufgenommen werden, sollen fortlaufend nummeriert werden.

Kommentare zu den internationalen Empfehlungen

Konträre Meinungen und Überlegungen zu einer genau definierten Frage können das Ziel eines einstimmigen

Konsenses mitunter verhindern. Zwei Themen waren in der ICAP-Debatte bisher nur durch Mehrheitsentscheidung zu einem Ergebnis zu führen. Zum einen die Frage nach einer ergänzenden Einführung von zusammengesetzten Mustern (*composite patterns*), wie es in den brasilianischen Konsensarbeiten als *complex patterns* beschrieben ist, und zum anderen die Frage, ob generell ein positiver Befund auf der HEp-2-Zelle als ANA-positiv gilt, auch wenn im Zellkern keine Fluoreszenz erkennbar ist.

Ein zusammengesetztes Muster (*complex or composite pattern*) sollte dadurch definiert sein, dass ein Antikörper in mehr als einem Zellkompartiment eine Anfärbung zeigt. Dazu würden das Muster passend zu NuMA zählen, das jetzt bei ICAP als mitotisches Muster (AC-26) geführt wird, das Muster passend zu CENP-F (derzeit AC-14) und das Muster von Anti-Topoisomerase I/Scl-70-Antikörper, das in ICAP bisher noch nicht erfasst wurde. Das Thema wurde in den ICAP-Treffen wiederholt diskutiert. Die Mehrheit aber war der Meinung, dass eine zusätzliche Musterkategorie keinen Vorteil bringt und eher zur Verwirrung führt in der Unterscheidung von echten gemischten Mustern, bei denen 2 oder mehr Antikörper zum Muster beitragen. Ein Konsens bezüglich Ergänzung durch eine eigene Kategorie „composite patterns“ konnte bisher nicht erreicht werden.

Derzeit noch anhaltend ist die Diskussion, wie ein Befund ausgegeben werden soll, wenn keine Anfärbung am Zellkern zu sehen ist, wohl aber im Zytoplasma oder nur in Zellen während der Mitosephase. Bereits im zweiten brasilianischen Konsens [12] wurde festgelegt, dass eine nur im Zytoplasma positive Probe als ANA-positiv ausgegeben werden soll, allerdings mit der Zusatzbemerkung, dass der ANA-Test auf HEp-2-Zellen Antikörper gegen alle zellulären Strukturen erfasst. In Italien sind die Empfehlungen des *Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni* (FIRMA) eindeutig. Ein zytoplasmatisch positiver Befund ist als ANA-positiv auszugeben (<http://www.grupprofirma.com>). Internationale Organisationen wie ACR oder EASI/IUIS legen zwar fest, dass neben Kernmustern auch zytoplasmatische und mitotische Muster angegeben werden sollen, nehmen aber keine Stellung, ob diese Muster isoliert auftretend auch als ANA-positiv bezeichnet werden sollen. Die österreichische und die deutsche EASI-Gruppe vertreten die Meinung, dass ein ANA-positiver oder -negativer Befund sich rein auf Antikörperbindung im oder am Zellkern beschränken soll, zytoplasmatische oder mitotische Anfärbungen aber am Befund ergänzend angegeben werden sollen. Auch die European Consensus Finding Study Group on Laboratory Investigation in Rheumatology (ECFSG) als

Tochtergesellschaft der European League Against Rheumatism (EULAR) erachtet ein rein zytoplasmatisches Muster als ANA-negativ [7].

Geplante Ergänzungen

Anhaltend in Diskussion befindlich ist die Ergänzung der Fluoreszenzmuster. Bereits im 2. ICAP-Treffen wurde von Karsten Conrad angeregt, dass man das Spektrum der gesprenkelten Muster durch das für SS-A/Ro typische Muster erweitern sollte. Von Manfred Herold wurde im 3. ICAP-Treffen ein fein retikuläres zytoplasmatisches Muster, das sich vom zytoplasmatisch retikulären und zu AMA passenden Muster (AC-21) unterscheidet und in Innsbruck häufig gesehen wird, zur Diskussion gestellt. Es wurde vorgeschlagen, eine neue AC-Nummer zu vergeben. In beiden Fällen konnte keine mehrheitliche Zustimmung gefunden werden. Auch die Frage, wie mit Mustern, die keinem der 28 ICAP-Muster zugeteilt werden können, verfahren werden soll, konnte bisher nicht geklärt werden. In Österreich werden in einigen Laboratorien mit dem ANA-Befund und der Musterangabe auch die AC-Nummern angeführt, ergänzt durch eine Anmerkung mit Hinweis auf die Internetseite www.anapatterns.org. In diesen Laboratorien wird ein nicht zuordenbares Muster ersatzweise als AC-xx ausgegeben und in einem zusätzlichen Hinweis vermerkt, dass das Muster durch ICAP noch nicht einer Kennzeichnung zugeordnet wurde.

Die Mustereinteilung nach ICAP wird zunehmend angenommen. Firmen, die HEp-2-Zellen vertreiben, ebenso wie solche, die Immunoassays für AAK-Spezifitäten anbieten, nehmen in ihrer Produktbroschüre immer öfter Bezug auf ICAP. Auch bei externen und von unabhängigen Organisationen angebotenen Qualitätskontrollen wird die Angabe der ICAP-Nummer verlangt. In Österreich wird die externe Qualitätskontrolle durch die Österreichische Gesellschaft für Qualitätssicherung und Standardisierung medizinisch-diagnostischer Untersuchungen (ÖQUASTA; www.oequasta.at) durchgeführt, die in ihren Autoimmunringversuchen seit 2015 nach der Zuordnung zu einer ICAP-Nummer fragt. Die Angabe erfolgt allerdings freiwillig und wird nicht beurteilt und soll lediglich der eigenen Wissenserweiterung und der Vereinheitlichung der Musterbezeichnung dienen. Die externe Qualitätskontrolle in Deutschland erfolgt unter anderem durch die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V. (INSTAND e.V.; www.instand-ev.de), welche seit Anfang 2017 für die Musterbeurteilung im Ringversuch Nr. 251 (Autoimmunerkrankungen 01)

die AC-Nomenklatur eingeführt hat. Die Ergänzung von bekannten oder von gelegentlich beobachteten und durch ICAP noch nicht zugeteilten Mustern ist eine im Vordergrund stehende Aufgabe. Das Muster, das durch Antikörper gegen DNA-Topoisomerase I/Scl-70 hervorgerufen wird, hat bisher noch keine Zuordnung. Die Lösung dieses Problems wurde als vorrangige Aufgabe aber bereits definiert. Die Schwierigkeit einer genauen Musterdefinition liegt darin, dass Anti-Topoisomerase I/Scl-70-Antikörper ein komplexes Muster verursachen und auch als Mischmuster mit anderen AAK auftreten können [13].

In der ersten ICAP-Sitzung wurde beschlossen, dass pro Muster 2 repräsentative Bilder auf der Internetseite gezeigt werden sollen. Jedoch wurden in der Zwischenzeit zahlreiche Anfragen eingereicht mit dem Anliegen, die Anzahl der Bilder zu erhöhen, um bessere Klarheit über die beschriebenen Muster zu erhalten und auch Unterschiede zwischen verschiedenen HEp-2-Zellpräparationen erkennen zu können. Es ist geplant, die Bildersammlung laufend zu ergänzen, wobei bei jeder Abbildung sowohl der Einsender als auch der Hersteller der HEp-2-Präparation angeführt werden sollen. Die Entscheidung, welche der eingereichten Abbildungen in die Mustersammlung aufgenommen wird, erfolgt durch Abstimmung innerhalb der ICAP-Arbeitsgruppe. Auch soll die Bildergalerie durch Abbildungen von ANA-negativen Proben (AC-0) erweitert werden. Bilder wurden bereits reichlich übermittelt, die Zustimmung zur Aufnahme in die Bildersammlung und zur Einführung einer zusätzlichen Bezeichnung AC-0 ist noch ausständig.

Die ANA-Suche mit iIF auf HEp-2-Zellen als Substrat bringt über das Fluoreszenzmuster zusätzliche Informationen bezüglich möglicher Zielantigene und der klinischen Bedeutung. Es wird überlegt, jedes Muster mit einer möglichen klinischen Bewertung zu versehen, die einheitlich als Ergänzung zum ausgegebenen Laborbefund angegeben werden könnte.

Diskussion

Für die Beschreibung der Fluoreszenzmuster auf HEp-2-Zellen gibt es bereits mehrere Vorschläge [2–5], aber noch keine auf breiter Basis diskutierte allgemein akzeptierte einheitliche Musterbeschreibungen. Die Ergebnisse des ANA-Suchtests auf HEp-2-Zellen werden in den meisten Laboratorien nach einer historisch gewachsenen und zum Teil laborspezifischen Nomenklatur ausgegeben. Zum Beispiel wird das nukleär grob gesprenkelte Fluoreszenzmuster (AC-5) als granular, gesprenkelt, speckled oder als

partikulär bezeichnet. Neben der Bezeichnung der Grundstruktur werden zusätzliche Adjektive wie fein, grob, distinkt oder atypisch angewendet. Für den Zuweiser sind Befunde aus unterschiedlichen Laboratorien deshalb kaum vergleichbar. Die ICAP-Initiative wurde ins Leben gerufen, um eine einheitliche Musterbeschreibung zu erreichen. Neben international weitgehend verständlichen englischsprachigen Musterbezeichnungen wurde mit der ergänzenden ICAP-Nummerierung die Möglichkeit geschaffen, Befunde auch zwischensprachlich vergleichbar zu machen. Ähnlich der CD-Nummerierung von Oberflächenantigenen auf Leukozyten in der Durchflusszytometrie soll die aufsteigende AC-Nummerierung definierter Fluoreszenzmuster ein einfaches und erweiterbares System der Klassifizierung schaffen. Auch die zunehmend eingesetzte automatisierte Differenzierung von Fluoreszenzmustern profitiert von einer standardisierten Nomenklatur.

Zukünftige ICAP-Treffen werden sich unter anderem auch mit Fragen der Erweiterung der bisher 28 definierten Fluoreszenzmuster beschäftigen und mit der Frage, inwieweit Präparate molekularbiologisch veränderter Zellen mit abweichender Antigenverteilung in das ICAP-System integriert werden können.

Autorenbeteiligung: Alle Autoren tragen Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Artikels und haben der Einreichung des Manuskripts zugestimmt.

Forschungsförderung: Keine.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al. Report of the First international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015 [review]. *Front Immunol* 2015;6:412.
2. Francescantonio PL, Cruvinel W de M, Dellavance A, Andrade LE, Taliberti BH, von Mühlen CA, et al. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells [English, Portuguese]. *Rev Bras Reumatol* 2014;54:44–50.
3. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as antinuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17–23.
4. Wiik AS, Hoier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35:276–90.
5. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:166–73.

6. Chan EK, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, et al. Report on the Second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) Workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016;25:797–804.
7. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights* 2016;7:1.
8. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(6 Pt 1):1211–20.
9. Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front Immunol* 2015;6:116.
10. 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;11:642–5.
11. Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;52:202–16.
12. Dellavance A, Júnior AG, Cintra AF, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti BH, et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2. *Rev Bras Reumatol* 2003;43:129–40.
13. Satoh M, Kuwana M, Ogasawara T, Ajmani AK, Langdon JJ, Kimpel D, et al. Association of autoantibodies to topoisomerase I and the phosphorylated (IIO) form of RNA polymerase II in Japanese scleroderma patients. *J Immunol* 1994;153:5838–48.